

**HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN  
CAND. PHARM.**

*Hanne Lund*

---

**Strategi for utvikling av LC-MS metode som  
diagnostisk verktøy for kvantifisering av  
tumormarkøren NSE i humant plasma**

---



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

**Universitetet i Oslo**

Høst 2006

*Hanne Lund*

---

**Strategi for utvikling av LC-MS metode som  
diagnostisk verktøy for kvantifisering av  
tumormarkøren NSE i humant plasma**

---

Hovedfagsoppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til november 2006.

Veiledere:

Professor León Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Cand. Pharm. Bjørn Winther, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Professor Elsa Lundanes, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo.

## FORORD

Til professor León Reubsaet og Cand. Pharm. Bjørn Winther: tusen hjertelig takk for stødig og tålmodig veiledning gjennom hele hovedfaget. Dere takler utålmodige, og til tider frustrerte studenter, på upåklanderlig vis! Ingen over, ingen ved siden. En stor takk rettes også til professor Elsa Lundanes for gode råd og veiledning, til professor Elisabeth Paus ved Det Norske Radiumhospitalet for donasjon av NSE, og til alle ansatte ved Faggruppen for Legemiddelanalyse for et hyggelig miljø.

Til Petter, Kari, Torill og Marte: det har vært en glede å være kontor-kamerater med dere, vi har hatt mange hyggelige kopper kaffe og samtaler. Petter: føler meg særlig heldig som har hatt deg som lab-makker og medsammensvoren gjennom hovedfaget. All honnør til deg. Og Christin, lunsj med deg har vært det daglige lyspunktet dette året!

Andreas, jeg setter uendelig stor pris på at du har holdt ut med det evige maset mitt om ”verdens viktigste hovedfagsoppgave”. Og at du i tillegg har latt som om den er svært interessant til en hver tid. Takk.

Oslo, oktober 2006

Hanne

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD .....</b>	<b>3</b>
<b>1. SAMMENDRAG .....</b>	<b>6</b>
<b>2. FORKORTELSER.....</b>	<b>8</b>
<b>3. INNLEDNING.....</b>	<b>10</b>
3.1 BAKGRUNN.....	10
3.2 HENSIKT.....	12
<b>4. TEORI .....</b>	<b>13</b>
4.1 PROTEOMIKK.....	13
4.2 EGENSKAPER TIL AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER .....	15
4.3 PROTEOLYTISK KLIPP AV PROTEINER.....	17
4.4 LC-MS.....	19
4.4.1 HPLC-systemet.....	19
4.4.2 Separasjon av peptider i et kromatografisk system.....	20
4.4.3 Massespektrometer og deteksjon av peptider.....	21
4.4.4 Proteinidentifisering ved hjelp av peptidmasse målinger.....	25
4.4.5 MS-MS.....	26
4.4.6 Identifikasjon av peptider ved hjelp av MS-MS.....	27
4.5 NSE: NEURON-SPESTIFIKK ENOLASE.....	30
4.6 STRATEGI .....	33
<b>5. MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>34</b>
5.1 KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR.....	34
5.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG BUFFERE .....	37
5.3 LC-MS FOR ANALYSER AV NSE I VANDIGE PRØVER.....	39
5.3.1 Oppsett av LC-MS for analyser av produkter fra tryptisk klipp av NSE i vandige prøver.....	39
5.3.2 Metoder for tryptisk klipp av NSE i vandige prøver.....	41
5.3.3 Deteksjon av peptider.....	43
5.3.4 Kontroll av peptiders spesifisitet.....	45
5.3.5: Prøveopparbeidelse: Felling av NSE i vandige prøver med ACN som fellingsreagens.....	45
5.4 LC-MS FOR ANALYSER AV NSE I PLASMAPRØVER .....	48
5.4.1 RAM: Restricted Access Media og kolonnesvitsjing .....	48
5.4.2 Oppsett av LC-MS for analyser av produkter fra tryptisk klipp av NSE i plasmaprøver.....	49
5.4.3 Prøveopparbeidelse: Felling av NSE og plasmaproteiner med ACN.....	51
<b>6. RESULTATER OG DISKUSJON.....</b>	<b>53</b>
6.1 INNLEDENDE FORSØK .....	53
6.1.1 Direkte kromatografering av NSE .....	53
6.1.2 Tryptisk klipp i vandige prøver.....	53
6.1.3 Kartlegging av spesifikke peptidprodukter.....	56
6.2 TESTING AV PEPTID-KARAKTERISTIKA .....	63
6.2.1 Spesifisitet .....	63
6.2.2 Bestemmelse av digest endepunkt .....	64
6.2.3 Intensitet.....	69
6.2.4 Analytiske hensyn: egnet retensjon av analytt på kolonne.....	70
6.3 FORBEREDELSE TIL PRØVEOPPARBEIDELSE I PLASMA.....	72
6.3.1 Felling av NSE med ACN i vandige prøver.....	72
6.4 PLASMAPRØVER.....	76
6.4.1 Felling av NSE-spikede plasmaprøver med ulike forhold ACN.....	76
6.4.2 Pasientprøve.....	80

<b>7. KONKLUSJON .....</b>	<b>81</b>
<b>8. REFERANSELISTE.....</b>	<b>82</b>

## 1. SAMMENDRAG

For å utvikle en metode som gjør det mulig å kunne foreta en kvantitativ bestemmelse av NSE i humant plasma ved hjelp av LC-MS, er det nødvendig å legge opp en strategi for optimalisering av proteinkromatografi og -deteksjon i komplekse prøvematrikser. Inngående kunnskap om fordelene ved å jobbe med peptider fremfor proteiner, ligger til grunn for den proteolytiske klippen av målproteinet. Videre arbeides det med peptidprodukter som er spesifikke for målproteinet.

NSE ble klippet med proteasen trypsin i vandig løsning, og peptidløsningen ble analysert. Peptidprodukter ble identifisert, og flere peptider ble verifisert ved MS-MS. Det ble satt 4 kriterier som grunnlag for å velge ut de beste peptidene til å representere NSE. Alle identifiserte peptider ble testet mot disse. Peptidproduktene ble testet for spesifisitet i forhold til andre plasmaproteiner. Deretter ble dannelsen av peptidprodukter monitorert over tid for å finne de peptidene som når optimalt endepunkt for den tryptiske klippen. Intensiteten som peptidene forekommer i ble vurdert. Det er avgjørende at den tryptiske klippen genererer peptider med høy signalintensitet. Dette vil gi lave deteksjonsgrenser. Retensjonen av peptidene på kolonnen ble evaluert som den siste avgjørende faktoren. Fire peptider ble på dette grunnlaget valgt ut som de beste kandidatene for deteksjon av NSE i prøver.

Som et ledd i prøveopparbeidelsen av plasmaprøver, ble fellingsprofilen til NSE kartlagt. Felling med ulike mengder ACN i vandig prøve ble utført. Best fellingsresultat for NSE ble oppnådd med 50 % ACN. Samme forsøket ble utført i spikede plasmaprøver og det ble bekreftet at felling med 50 % ACN var det mest egnede fellingsforholdet.

Til slutt ble den utviklede metoden for bestemmelse av NSE i humant plasma applisert på plasmaprøver fra pasienter med påvist småcellet lungekreft. Konsentrasjonen av NSE i disse prøvene var på forhånd bestemt av Det Norske Radiumhospitalet til 235 µg/L. Resultatene viste tydelig spor av NSE i pasientprøvene, noe som bekrefter et godt

utgangspunkt for videre optimalisering av LC-MS som metode for kvantitative bestemmelser av NSE i human plasma, og som diagnostisk verktøy.

## 2. FORKORTELSER

ACN	Acetonitril
ADS	Akyl-Diol-Silica
CH <sub>3</sub> COOH	Eddiksyre
CEA	Carcinoembryonic Antigen
Da	Dalton
DNA	Deoksy Ribonucleic Acid
ED	Utbredt sykdom (Extensive Disease)
ESI	Elektrospray ionisering (Electrospray ionization)
GRP	Gastrin Releasing Peptide
HCOOH	Maursyre
HPLC	Væskeskromatografi (High-Performance Liquid-Chromatography)
HSA	Humant serumalbumin
H <sub>2</sub> O	Vann
LC-MS	Væske kromatografi-massespektrometri (Liquid Chromatography-Mass spectrometry)
LD	Begrenset fremskreden sykdom (Limited Disease)
Lys-C	Lysobacter enzymogenes C
M	Molar
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionisation
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA (ribonucleic acid)
m/z	Forholdet masse/ladning
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
NH <sub>3</sub>	Ammoniakk
NSE	Neuron Spesifikk Enolase
NSCLC	Ikke småcellet lungekreft (Non Small Cell Lung Cancer)
O.C	On Column
ProGRP	Pro Gastrin Releasing Peptide
RAM	Restricted Access Media



---

RPC	Omvendt fase kromatografi (Reversed Phase Chromatography)
RSD	Relativt standardavvik (Relative Standard Deviation)
SCLC	Småcellet lungekreft (Small Cell Lung Cancer)
SIM	Selektiv ionemonitorering (Selektive Ion Monitoring)
TEA	Trietanolamin
TIC	Totalt ionestrøm (Total Ion Current)
TOF	Time of flight
µL	Mikroliter
Å	Ångstrøm
A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Fenylalanin
G	Glysin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
T	Treonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin
Ser	Serin

### 3. INNLEDNING

#### *3.1 Bakgrunn*

Småcellet lungekreft (SCLC) er en aggressiv og hurtigvoksende form for tumor. Denne typen lungekreft utgjør ca 20 % av alle typer lungekreft, mens ikke småcellet lungekreft (NSCLC) utgjør resterende 80 %. SCLC er vanligvis delt inn i to kategorier: limited disease (LD) dersom sykdommen er begrenset fremskreden, og extensive disease (ED) hvis sykdommen er svært fremskreden. Til tross for god følsomhet ovenfor initial behandling, vil nesten alle pasientene med ED, og mer enn 80 % av pasientene med LD, dø av tilbakefallende sykdom innen 3 år (Niho, Nishiwaki et al. 2000). Hos hovedandelen av pasienter med SCLC har sykdommen metastasert til regionale lymfeknuter eller distanserte organer innen den tid diagnosen stilles. Siden SCLC er svært følsom overfor kjemoterapi og radioterapi, vil tidlig diagnostisering etterfulgt av korrekt kombinasjonsbehandling være det absolutt beste utgangspunktet for pasienter med SCLC (Shibayama, Ueoka et al. 2001).

For å kunne stille en korrekt diagnose så tidlig som mulig, må selv et tidlig stadium av sykdommen kunne fanges opp. Tumormarkører kan være substanser produsert av tumorceller. Disse kan vitne om tumors tilstedeværelse i kroppen. I tillegg kan et forhøyet eller et forminsket nivå av enkelte komponenter i blod også være indikasjon på sykdom, selv om disse ikke er produsert direkte av tumor selv. Når tumormarkørene forekommer systematisk vil de være tilgjengelige for deteksjon i blod. Tumormarkører kan være til nytte i screening, tidlig diagnostisering av kreft, og til å fastslå grad av sykdom. Når markørene måles med jevne mellomrom etter diagnose kan de være mål på responsen på behandling, et mål på sykdomsutvikling, og de kan benyttes til overvåkning av eventuell residiv av cancer. Mange tumormarkører kan også benyttes som prognostiske faktorer, enten alene eller i kombinasjon med andre histopatologiske, biokjemiske eller kliniske variabler (Ferrigno, Buccheri et al. 2003).

I rutinediagnostikk i laboratorier er identifisering av spesifikke sykdomsassociererte proteiner som eksisterer i lave konsentrasjoner i serum, i stor grad basert på dyre og tidskrevende metoder. Radiomerking eller enzymbundne immunoassay metoder (RIA og ELISA) er metoder som kun har mulighet til å detektere én enkelt, allerede kjent, proteinkomponent av gangen. Det er dessuten en generell oppfatning at grunnet den heterogene naturen til de fleste sykdomsforløp (der i blant SCLC) finnes det ingen sykdomsmarkør som alene vil være tilstrekkelig indikativ. Man søker derfor metoder som vil kunne kombinere flere markører samt ha mulighet til å oppdage nye markører som kan supplere allerede eksisterende diagnostiske/prognostiske tester (Ahmed and Rice 2005).

LC-MS og LC-MS/MS tilbyr mange fordeler i bioanalyse når man sammenlikner med konvensjonelle analysemetoder: lav deteksjonsgrense (ned i pikogram-nivå), kort analysetid, høy spesifisitet, mulighet for å applikere på nesten enhver analytt, samt god nøyaktighet og presisjon. Man vil med andre ord kunne teste konsentrasjonsnivået til flere tumormarkører samtidig ved hjelp av en enkelt analyse av pasientens blodprøve når man benytter LC-MS som analysemetode fremfor immunologisk baserte metoder (Greibrokk 1998; Reubsæet 2003).

NSE, gammaenheten av enolase, er bredt akseptert som tumormarkør for småcellet lungekreft. Et forhøyet nivå av NSE før behandling er observert hos 40-70% av pasientene med LD, og hos 83-98% av pasientene med ED (Paus and Risberg 1989; Paus and Myklebust 1995; Ferrigno, Buccheri et al. 2003). NSE er derfor et godt utgangspunkt når man skal velge en substans for utvikling av en ny metode for deteksjon av tumormarkører i serum.

### ***3.2 Hensikt***

Hensikten med oppgaven er å finne en strategi for hvordan NSE kan bestemmes i humant plasma ved hjelp av LC-MS. Sentrale utfordringer i dette er da: hvilke produkter oppstår etter tryptisk klipp av NSE, hvordan analyseres disse og hvordan skal prøveopparbeidelsen av plasma gjennomføres?

## 4. TEORI

### *4.1 Proteomikk*

Der man sier at genetikk er studien av genomet, kan man si at proteomikk er studiet av proteomet; proteinproduktene til genomet. Analyse av totale protein uttrykt i cellevæsker, organismevev eller kroppsvæsker kalles i dag proteomikk (Romijn, Krijgsveld et al. 2003).

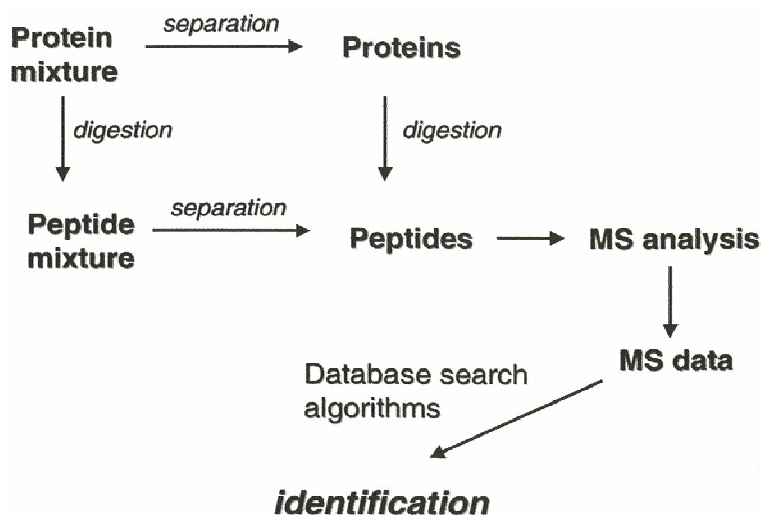
Feltet proteomikk er avhengig av ulike verktøy som har blitt utviklet og forbedret i den senere tid. Databaser for proteiner tilbyr komplette kataloger med flere typer data over alle proteiner uttrykt i gitte organismer. Disse databasene i kombinasjon med data fremskaffet av massespektrometre muliggjør identifisering av proteiner.

Massespektrometre er svært følsomme, robuste instrumenter som er i stand til å analysere biomolekyler, spesielt proteiner og peptider. MS tilbyr tre typer analyser som alle er svært nyttige innenfor proteomikk. Først og fremst tilbyr MS nøyaktige målinger av molekylmassen til intakte proteiner, helt opp i størrelsesorden 100 kDa eller mer (Liebler 2002). Måling av molekylmassen til proteiner er generelt av begrenset interesse da de ofte ikke er følsomme nok (dette avhenger av hvor nøyaktig og hvor høy oppløsning MS har), og fordi netto masse ofte er utilstrekkelig for å med sikkerhet kunne identifisere et protein.

MS kan også tilby nøyaktige massemålinger av peptider fra proteolytiske digests, det vil si klippeproduktene til et protein som har blitt klippet opp av en protease. I motsetning til målinger foretatt på massen til hele proteinet, kan målinger på peptidmasser gjøres med større følsomhet og nøyaktighet (Liebler 2002). Dataene fra peptidproduktene fra klipp av et protein kan matches direkte mot tidligere nevnte databaser for å oppnå en sikker identifisering av målprotein.

Til sist kan MS-analyser av peptidprodukter fra proteolytiske digests fremskaffe informasjon av nevnte peptiders aminosyresekvenser ut fra peptidfragmentering og videre analyse av fragmenteringsproduktene (Liebler 2002; Trauger, Webb et al. 2002; Romijn, Krijgsveld et al. 2003). Også her er matching av fragmenteringsmønsteret mot data fra en database nødvendig for identifisering.

Proteinseparasjon er utgangspunktet for proteomikk. Grunnet begrensning i apparaturen er det nødvendig å forenkle komplekse proteinprøver (for eksempel plasmaprøver) før de ønskede proteinene kan analyseres videre med størst mulig følsomhet og nøyaktighet. Dette skjer gjerne under prøveopparbeidelsen. Denne separasjonen tillater forskere å målrette analysen mot spesifikke proteiner (Liebler 2002). Her sees det ikke lengre på hele proteomet, men på utvalgte proteiner. Deretter klippes målproteinene opp før peptidproduktene separeres ved hjelp av en egnet separasjonsmetode, gjerne HPLC. Så detekteres peptidene etter tur av et massespektrometer. Dataene generert av MS kan brukes til identifikasjon av peptider eller proteiner; eller hvis peptidsekvensene allerede er kjente, kan kvantitative bestemmelser foretas, om dette er målet. Nedenfor er et generelt flytskjema for proteomikk-analyser summert opp i figur 4-1.



Figur 4-1: Generelt flytskjema for proteomikk-analyser

## ***4.2 Egenskaper til aminosyrer, peptider og proteiner***

Proteiner er de hyppigst forekommende makromolekylene som er til stede i alle celler og alle deler av cellene. Genetisk informasjon uttrykkes via proteiner, som er produktet av et genom, selve koden for arvelig informasjon.

Alle proteiner er bygget opp av enkeltenheter som er aminosyrer. Disse danner en kjede, og avhengig av kjedens lengde kalles kjeden for protein eller peptid. Aminosyrener er kovalent bundet til hverandre i lineære sekvenser. Alle aminosyrer har en felles grunnstruktur, med en variabel sidekjede som skiller de ulike aminosyrener fra hverandre. Proteiner er satt sammen av ikke mer enn 20 ulike aminosyrer, da de tilhørende ulike egenskapene gir muligheter for et utall kombinasjoner. Ut fra dette klassifiseres også aminosyrener, avhengig av om sidekjeden er:

- Upolar og alifatisk
  - Glycin
  - Alanin
  - Prolin
  - Valin
  - Leucin
  - Isoleucin
  - Methionin
- Aromatisk
  - Fenylalanin
  - Tyrosin
  - Tryptopfan
- Polar og uladet
  - Serin
  - Threonin
  - Cystein
  - Asparagin
  - Glutamin

- Basisk
  - Lysin
  - Histidin
  - Arginin
- Sur
  - Aspartat
  - Glutamat

Proteinstrukturer kan sees på flere ulike nivå. Primærstrukturen til proteinet består av en aminosyresekvens bundet sammen av peptidbindinger, og inkluderer disulfidbroer som forekommer mellom to aminosyrer av typen cystein. Det resulterende polypeptidet kan foldes til en sekundær struktur, for eksempel en  $\alpha$ -heliks. Heliksen er en del av en tertiær struktur av det foldede polypeptidet, som igjen kan være en subenhet i en kvarternær struktur til et protein bestående av flere subenheter (for eksempel hemoglobin)(Nelson and Cox 2005).

### **Peptider i løsning**

Når peptidene analyseres er de i kontrollerte kondisjonerte omgivelser. Egenskapene til de ioniserbare funksjonelle gruppene til peptidene vil være styrt av pH i løsningen. Karboksylsyrer er protonerte (uioniserte) ved pH under 3.0 og ionisert ved pH-verdier over 5.0. I motsetning vil N-terminal aminer og histidin være ionisert ved pH under 7.0 da disse er svake baser. Lysin og arginin har funksjonelle grupper inneholdende nitrogen som vil være ionisert ved pH mindre enn 8.5. Dette si at ved sur pH rundt 2 vil peptidet totalt ha en positiv ladning (Liebler 2002; Reubsæet 2006). Dette utnyttes i separasjonen og deteksjonen av peptider og proteiner.



### ***4.3 Proteolytisk klipp av proteiner***

I stedet for å analysere massene til hele proteiner, benyttes det ofte proteaser til å klippe de store proteinene til mindre peptider. Siden massene til peptidene er betraktelig mindre enn den totale proteinmassen, blir målingene mer nøyaktige, i tillegg til at følsomheten er bedre. Hvis proteinet i tillegg til å være stort er hydrofobt, vil dette vanskeliggjøre bestemmelse av masse ytterligere. Ved å velge seg ut peptider som er spesifikke for målprotein vil sistnevnte kunne bestemmes til fulle da antall mol spesifikt peptid er representativt for antall mol målprotein. Dette forutsetter at klippingen av foreldreprotein er fullstendig.

Det finnes mange proteaser som klipper proteiner, men trypsin er mest brukt. Trypsin klipper proteiner etter aminosyrene lysin og arginin ved C-terminalen i aminosyrekjeden, med mindre ingen av disse er etterfulgt av aminosyren prolin. Forekomsten av lysin og arginin i de fleste proteiner er så pass hyppig at klipping genererer peptider av størrelse godt egnet for MS-analyse (Liebler 2002).

Noen proteiner, særlig de som er spesielt store og hydrofobe, eller utøver egenskaper som påvirker foldingen av proteinet på annen måte, for eksempel disulfidbroer, kan være vanskeligere for trypsin å klippe enn andre. Områder av proteinet kan være mindre eksponerte og dermed mindre tilgjengelige for proteasen. Dette vil kunne føre til en ufullstendig klipping, som igjen vil kunne påvirke kvantitative målinger av målprotein, i tillegg til at følsomheten nedsettes. Disulfidbroer stabiliserer den tertiære strukturen til proteiner, og ved å bryte disse bindingene forenkler man utfoldingen av proteinet og dermed den proteolytiske digesten av proteinet. Teknikken som benyttes er denaturering av proteinet med påfølgende reduksjon og alkylering. Frie tiolgrupper er svært reaktive, og vil oksidere spontant med andre tiolgrupper. På grunn av dette blokkeres tiolgruppene ved alkylering for å forhindre uønskede reaksjoner fra å forekomme under analyse (Hale, Butler et al. 2004). Enkel denaturering uavhengig av tilstedeværelsen av disulfidbroer kan også være aktuelt.

For proteiner i komplekse prøvematrikser som plasma, kan det være en fordel å foreta en pre-digest før man eventuelt påfølger med tryptisk klipp direkte, eller denaturerer, reduserer og alkylerer før proteasen tilsettes. Pre-digest utføres ved hjelp av Lys-C (protease) som klipper etter aminosyren lysin. På denne måten klippes de store proteinene opp til mindre deler på forhånd før trypsin tilsettes prøven. Proteinene vil dermed være mer tilgjengelig for trypsin, og en mer fullstendig klipp som når et endepunkt blir enklere å oppnå.

## **4.4 LC-MS**

LC-MS består av et separasjonssystem (HPLC) som, avhengig av de kjemiske egenskaper til de ulike analyttene (peptidproduktene) vil skille disse fra hverandre, fulgt av deteksjon i massespektrometeret. Når et massespektrometer benyttes som detektor, kan det gi strukturinformasjon om analyttene i tillegg til kvantifisering. Totalt utgjør dette et velegnet separasjons- og deteksjonssystem med svært lave deteksjonsgrenser, gjerne helt ned i pikogram-nivå.

### **4.4.1 HPLC-systemet**

HPLC er et kromatografisk system. Kromatografi er et samlenavn på separasjonsmetoder som er basert på det prinsipp at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil mens den andre er stasjonær. Separasjonen av stoffene er med andre ord avhengig av stoffenes interaksjon med stasjonærfasen, og dermed hvor godt denne retarderer stoffene.

HPLC-systemet består av følgende komponenter (se figur 5-1 side 40 for oppsett):

- To reservoar for mobilfase 1 og 2
- Blandekammer
- To pumper for hver av mobilfasene
- Auto-injektor
- Degasser
- Kolonne

Pumpe A og B pumper henholdsvis mobilfase 1 og 2 gjennom systemet. I blandekammeret kan forholdet mellom de to mobilfasene varieres slik at en stigende gradient kan etableres over kolonnen. Denne vil eluere analyttene ut av kolonnen ved ulike tidspunkt ut fra analyttenes kjemiske egenskaper og gradientens styrke. Degasseren forhindrer luft i systemet, da dette vil kunne forårsake ujevn væskehastighet, som igjen

vil påvirke separasjonen. På kolonnen separeres analyttene. Retensjonen i et kromatografisk system kan styres ved å forandre egenskapene til stasjonærfase og mobilfase, forandre mobilfase-hastighet, lengde på kolonne, temperatur og analyttenes egenskaper i prøven (Greibrokk 1998).

#### **4.4.2 Separasjon av peptider i et kromatografisk system**

Peptider har ulike hydrofobe egenskaper. En omvendt fase kolonne vil dermed kunne være egnet til separasjon av peptider, da denne har en upolar stasjonærfase. Den viktigste interaksjonen som finner sted mellom peptidene og stasjonærfasen er Van der Waalske krefter, relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Dette innebærer at det i hovedsak er størrelsen på den upolare delen av molekylet som har effekt på retensjonen. Sammen med en relativt polar mobilfase vil systemet kunne eluere ut peptidene: de mest hydrofile først, og de mest hydrofobe til slutt. Graden av polaritet til mobilfasen vil påvirke elueringstiden som man dermed kan regulere; desto mindre polar mobilfase, jo kortere elueringstid. Det er viktig å merke seg at dette vil ha innvirkning på separasjonen av analyttene. Separasjonen vil forringes hvis mobilfasen er for hydrofob og elueringstiden for kort. En annen måte å forkorte elueringstiden på, er ved å kjøre en gradient over den omvendte fasen. Det innebærer at mobilfasens hydrofobe karakter (det vil si løsemiddelstyrke) øker utover i programmet til analysekjøringen. Dette vil også kunne gi dårligere separasjon, men vil være gunstig hvis separasjonen ved isokratisk kjøring (hvor mobilfasen har konstant løsemiddelstyrke) er så pass stor at man med fordel kan korte inn analysetiden, uten at analyttene eluerer ut oppå hverandre (Greibrokk 1998).

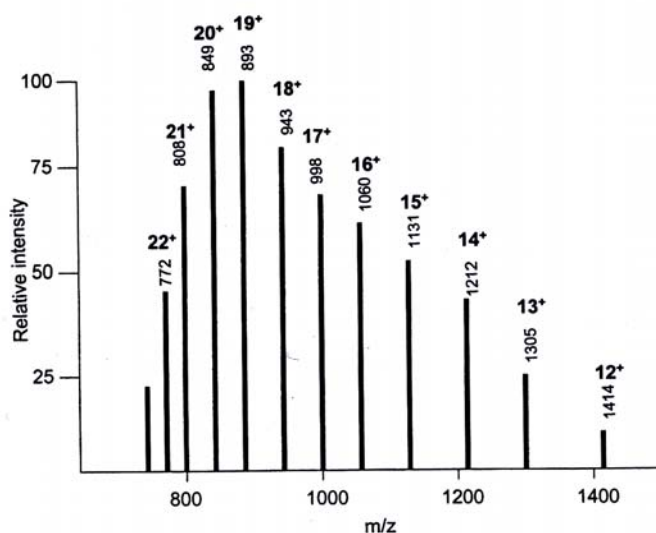
#### 4.4.3 Massespektrometer og deteksjon av peptider

Et massespektrometer er bygd opp av

- ionekilde
- masseanalysator
- detektor

Disse delene som sammen utgjør et massespektrometer, konverterer komponenter fra en løsning til ioner i gassfasen, og analyserer dem deretter ut fra deres masse over ladning ( $m/z$ ) forhold.

I utgangspunktet kan hele proteiner identifiseres ved bruk av MS. Dette avhenger av type MS. Molekylmassen til hele proteinet vil ikke kunne detekteres når MS er ESI- kvadrupol eller ionefelle, siden denne vil være svært stor og langt over kapasiteten til MS (MALDI-TOF har større kapasitet og kan detektere molekylmassen til hele proteiner). Siden masse over ladningsforholdet kan måles, vil det ut fra dette være mulig å bestemme molekylmassen til et protein med ESI-kvadrupol. Et massespektrum til et protein består av flere topper som hver og en representerer molekylmassen til proteinet, men i form av ulikt ladede ioner. En matematisk kalkulasjon benyttes for å bestemme molekylmassen (Reubsæet 2003).



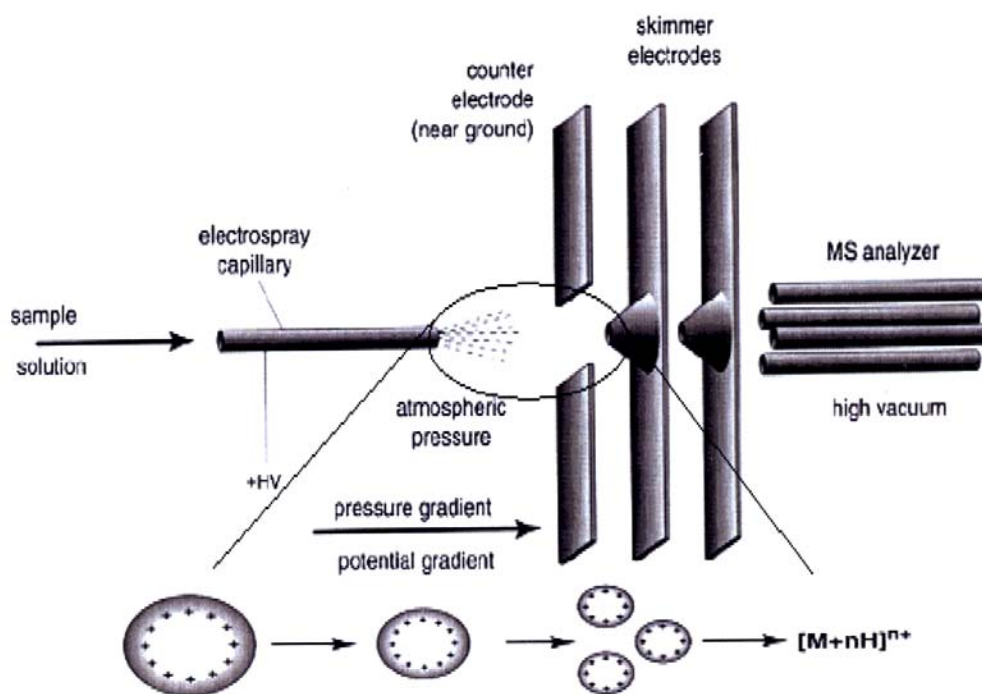
Figur 4-2: Distribusjonsmønster til et protein analysert av MS (Liebler 2002)

Antall proteiner som kan forekomme i en biologisk matriks er stor. God følsomhet, oppløsning og nøyaktighet etterstrebes for at dataene generert av MS skal kunne gi et så presist som mulig bilde av hva prøvematriksene inneholder. Mange peptider har svært like verdier for  $m/z$ , så for å skille disse ionene fra hverandre er god oppløsning viktig. Når data basert på masse skal brukes til å identifisere peptider ved sammenlikning mot database-verdier, avhenger dette av at massen målt på peptidene er nøyaktig, det vil si så lik som mulig den verdien som peptidene faktisk har (Liebler 2002).

### **ESI: Elektro spray ionisation**

Det finnes flere typer ionekilder som ved bruk av ulike teknikker ioniserer molekyler, blant annet ESI og MALDI. Ioneproduktene vil da ha  $m/z$  som er direkte knyttet til molekulmassen til peptidet. ESI er velegnet for peptid og proteinanalyse av ulike grunner. Kompabilitet med væskeskromatografi og med både enkel og tandem masseanalysatorer er viktige faktorer. Viktigst er kanskje likevel at ESI åpner for flere ladninger på peptidene, og dermed for bruk av analysatorer med begrenset  $m/z$ -bredde (Trauger, Webb et al. 2002). ESI er en myk ioniseringsteknikk.

ESI er den ioniseringsteknikken som ble benyttet i denne oppgaven. Små dråper dannes ved hjelp av et elektrisk felt og forstøvergass ( $N_2$ ) når mobilfasen innføres i ioniseringsenheten i ESI. Disse dråpene kan enten få positiv ladning (positive mode) eller negativ ladning (negative mode) alt ettersom hva innstillingen på ESI er. På grunn av at peptider og proteiner ved pH 2-2.5 totalt sett har en positiv ladning, er det vanlig at deteksjon av disse blir utført i positiv mode. Mindre og mindre dråper dannes ettersom tørkegass (også denne  $N_2$ ) fjerner mobilfasen ved fordampning. Etter hvert vil ionene frastøte hverandre så sterkt at dette overgår overflatespenningen, og de små dråpene eksploderer til enda mindre dråper som fortsetter å fordampe. Denne prosessen kalles *Coulomb explosion*. Dette vil fortsette til fullstendig fordampning av ionene. Ionene dras deretter inn i masseanalysatoren (Greibrokk 1998; Liebler 2002; Reubsaet 2003). I figur 4-3 er ionisering av peptider ved bruk av ESI illustrert. Ionefordampningen (*Coulomb explosion*) er uthevet nederst på figuren.



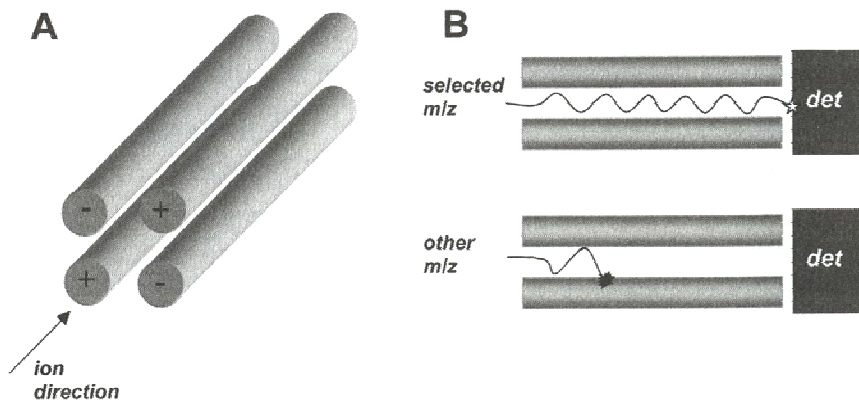
Figur 4-3: MS med ESI. Nederst på figuren er ionefordampning (Coulomb explosion) illustrert

ESI danner flere ganger ladede ioner fra peptider og proteiner. Ettersom peptider derivert fra tryptisk digest vil ha lysin eller arginin ved C-terminalen av aminosyresekvensen, i tillegg til N-terminale aminogrupper, vil disse ha opptil flere proton-akseptor seter som ved sur pH vil protoneres. Peptidene vil i løsning ha minst en eller flere ladninger. I motsetning til intakte proteiner vil peptider i størrelsesorden 250-2500 Da vanligvis foreligge som en blanding av en, to eller tre ganger ladede ioner, avhengig av størrelse, aminosyreantall og aminosyrenes egenskaper. For tryptiske peptider i denne størrelsesordenen er det vanlig at to ganger ladede ioner dominerer, men at en og tre ganger ladede ioner også observeres (Liebler 2002).

### Masseanalysator

De ioniserte molekylene vil i en masseanalysator separeres etter sitt masse over ladning forhold,  $m/z$ -verdier. I dette tilfellet er masseanalysatoren en enkel kvadrupol bestående av fire parallelle sylindriske staver. Ved å legge på en spenning og en frekvens, vil de ioniserte molekylene med ulike  $m/z$ -verdier slippe gjennom til detektoren, en etter en,

ettersom hvordan de oscillerer gjennom kvadrupolen. Ustabile ioner vil kollidere med stavene, mens ionene som oppnår stabile svinginger vil bevege seg mot detektoren. Det vil si at ioner med en gitt  $m/z$  verdi passerer gjennom kvadrupolen, mens ioner med lavere eller høyere  $m/z$  blir holdt tilbake. Dette er illustrert i figur 4-4 under.



Figur 4-4: (A) Kvadrupol (B) Svingningene til et ion med utvalgt  $m/z$  verdi (øverst) og til ioner med andre  $m/z$  verdier (nederst) (Liebler 2002)

### Deteksjonsmuligheter

Massespektrometeret kan ved kombinasjon med kromatografi operere etter to forskjellige prinsipper; man kan enten ta opp fulle massespektre (fulle sveip) for eksempel hvert sekund ved at masseanalysatoren sveiper over massene en etter en, eller man kan kontinuerlig måle på kun en enkelt masse. Ved å gjøre fulle sveip (scan mode) får man mye strukturinformasjon fordi det er tilgjengelig massespektre for hvert av de separerte stoffene, men ulempen er at følsomheten er begrenset og at det derfor kan være vanskelig å detektere forbindelser på meget lave konsentrasjonsnivåer. Dersom man ønsker dette, eller ønsker å utføre kvantitative bestemmelser er det vanlig å ikke ta opp fulle massespektre, men stille inn på en bestemt masse gjennom hele tidsperioden hvor separasjonen foregår. Dette kalles selektiv ionemonitorering (SIM). Vanligvis kan  $m/z$  verdier opp til 2000 bestemmes (hvilket kvadrupolen som ble benyttet i oppgaven kan), men noen instrumenter kan bestemme  $m/z$  verdier helt opptil 4000.



#### 4.4.4 Proteinidentifisering ved hjelp av peptidmasse målinger

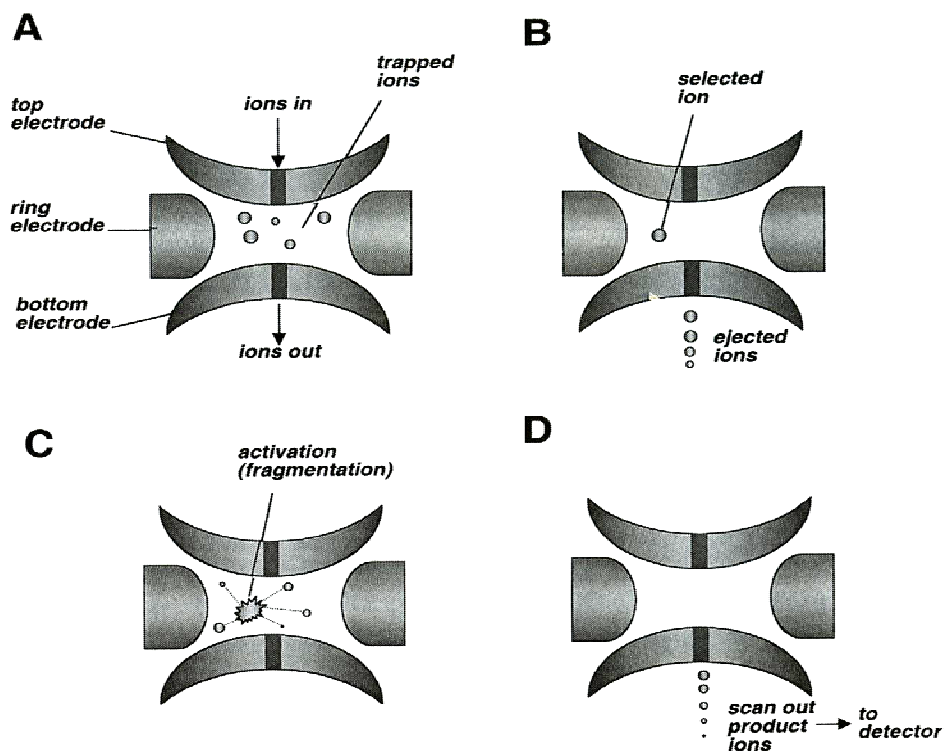
Skal man bruke ett peptid til å monitorere et protein, er det visse krav som stilles til dette peptidet. En proteolytisk klipp vil generere mange ulike peptidprodukter. Enkelte peptider vil være mer egnet som representanter for foreldreproteinet enn andre (se avsnitt om strategi under 4.5). Det viktigste kriteriet for å selektere bort uegnede peptider er selektivitet. Aminosyresekvensen må være unik.

Ved å måle  $m/z$  verdiene til peptidproduktene etter proteolytisk klipp av et protein, kan disse sammenliknes mot en database, for eksempel *ProteinProspector* ([www.http://prospector.ucsf.edu/](http://prospector.ucsf.edu/)). Denne inneholder oversikten over alle de teoretiske massene til produktene etter en klipp av et gitt protein foretatt av en gitt protease. Dette kalles en in-silico digest (klipp). Enkelte peptidsekvenser vil være spesifikke for foreldreproteinet. For å finne ut hvilke sekvenser som er spesifikke og hvilke som ikke er det, må hvert peptids aminosyresekvens sjekkes mot en database, for eksempel *Bioanalytical Research Group* (<http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>) for mulig matching med peptidsekvenser fra andre proteiner. For en sikrest mulig identifisering av målproteinet, bør man imidlertid ha flere slike spesifikke peptidprodukter å støtte seg på (Liebler 2002; Romijn, Krijgsveld et al. 2003).

Ut fra det analytiske aspektet, er det avgjørende at identifiseringen som gjøres av peptidproduktene er så nøyaktig som mulig. Her finnes det flere parametere å støtte seg på. Viktigst er å utnytte de ulike masse over ladning verdiene som et enkelt peptid vil kunne ha. ESI genererer vanligvis to og tre ganger ladede peptidioner. Disse gir utslag i form av hver sin topp i kromatogrammet, ved en gitt retensjonstid. Siden begge  $m/z$ -verdiene symboliserer ett og samme produkt, vil de tilhørende toppene ha samme retensjonstid. Med andre ord; minst to ulike masse over ladning verdier, tilhørende samme peptid, detektert ved nøyaktig samme tidspunkt, må observeres for å konstatere identiteten til ett enkelt peptidprodukt. Dette er da et utgangspunkt for identifisering av et peptid. Identiteten bør imidlertid verifiseres ved hjelp av MS-MS.

#### 4.4.5 MS-MS

Det finnes flere ulike MS-MS instrumenter som alle kan fragmentere og verifisere identiteten til peptider, for eksempel tripple kvadrupoler og ionefeller. Det var ionefelle som ble benyttet i denne oppgaven. En ionefelle fungerer på følgende måte: ionene fra kilden dirigeres inn i ionefellen (figur 4-5 A). Så vil ionet av interesse velges ut og spenningene i fellen innstilles slik at ionene med andre  $m/z$  verdier sendes ut av fella (figur 4-5 B). Spenningen vil deretter raskt økes for å øke energien til de gjenværende ionene, hvilket resulterer i kollisjon mellom ionene og heliumgassen i fella (figur 4-5 C). På denne måten oppstår kollisjonsindusert fragmentering av peptidionene. Fragmentene holdes inne i fella, og slippes ut på grunnlag av deres  $m/z$  verdier, hvorpå de så detekteres (figur 4-5 D).



Figur 4-5: Skjematisk representering av et ionefelle MS instrument. (A) Fangning av ioner inni analysatoren; (B) den sekvensielle utslippen av ioner med forskjellige  $m/z$ ; (C) kollisjonsindusert fragmentering av utvalgte ioner; (D) utslipping av ioneprodukter derivert fra fragmenteringen (Liebler 2002)

Fragmenteringsmønstrene som genereres av MS-MS med ionefeller kan være litt forskjellige fra fragmenteringsmønstrene produsert av MS-MS med trippel kvadrupol. Dette er fordi ionefellene ser ut til å indusere en mye mer komplett fragmentering av peptidionene enn trippel kvadrupolene. Dermed vil signalet til foreldrepeptidet vanligvis ikke sees i ionefelle MS-MS spekteret. Dette er det dominerende signalet i trippel kvadrupol MS-MS spekteret, hvor fragmenteringen ikke er fullstendig og en stor andel av foreldrepeptidet fremdeles er intakt.

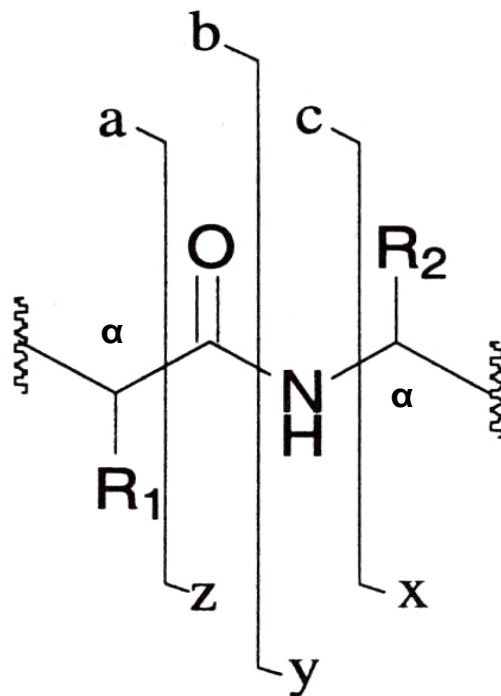
I tillegg har ionefellene den unike egenskapen at fragmenterte ioner fra et MS-MS eksperiment kan holdes tilbake i fella og utsettes for enda en runde fragmentering. Disse fragmentene kan igjen holdes igjen og fragmenteres. Denne type analyse refereres til som  $MS^n$  og kan providere høydetajlert fragmenteringsinformasjon. Dette er imidlertid sjeldent benyttet innen proteomikk, men muligheten er tilstedet. Ulempen med ionefellen er at den har en såkalt lav  $m/z$  cut-off for MS-MS. Det er ikke mulig å ta opp massene til produktionene som har  $m/z$  verdier under ca 25 % av  $m/z$  verdien til foreldreionet som først ble utsatt for MS-MS. Dette er vanligvis ikke et problem for peptid MS-MS analyse, fordi identiteten til lav-masse fragmenter kan generelt bestemmes fra  $m/z$  verdier til korresponderende større fragmenter (Liebler 2002).

#### 4.4.6 Identifikasjon av peptider ved hjelp av MS-MS

Peptiders aminosyresekvens kan bestemmes ved hjelp av MS-MS. Som beskrevet ovenfor vil det dannes fragmenter etter at kollisjon mellom inerte gass-molekyler og peptider er indusert. Et bredt akseptert nomenklatur benyttes for å beskrive denne peptidion-fragmenteringen. Dette nomenklaturet er designet av Roepstorff (Liebler 2002; Reubsaet 2003).

Flere ulike typer ioner kan dannes etter kollisjonsindusert fragmentering. a-, b- og c-ioner er ionene som dannes på N-terminal delen av peptidet, mens x-, y- og z-ionene er de korresponderende ionene på C-terminaldelen av peptidet. Av disse ionene er det

dannelse av b-ioner og de korresponderende y-ionene som skjer hyppigst, da denne fragmenteringen krever minst energi. Her er det bindingen mellom karbonylkarbonet og amidnitrogenet som brytes. I figur 4-6 er det illustrert hvor i aminosyrekjeden de ulike framenteringene skjer.



*Figur 4-6: Skjematisk representering av nomenklaturet for fragmentering av peptidioner (Liebler 2002)*

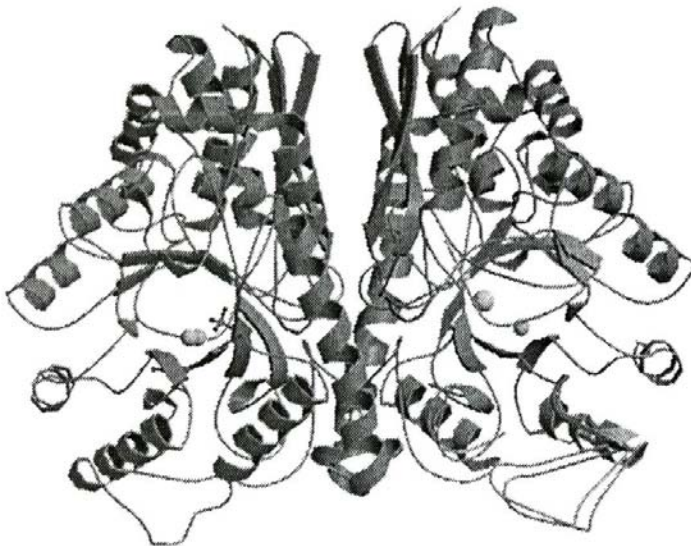
Sidekjedene som gir hver aminosyre sin spesielle kjemi, er festet til alfa-karbonet. Det er disse sidekjedene som gir hver aminosyre ulike masser som kan detekteres av MS. I tabellen nedenfor er sammenhengen mellom gjennomsnittlig monoisotop masse som er målt av MS og tilhørende aminosyre presentert. På denne måten kan MS-MS generere m/z data som matches mot in-silico genererte m/z verdier for fragmenteringsproduktene til hver enkelt sekvens som skal identifiseres/verifiseres (Liebler 2002; Reubsaet 2003).

*Tabell 4-1: Gjennomsnittlig monoisotop masse til aminosyreresiduene (Liebler 2002)*

Aminosyre	Forkortelse	Monoisotop masse til aminosyre-residuene
Glysin	G	57,05
Alanin	A	71,08
Serin	S	87,08
Prolin	P	97,12
Valin	V	99,13
Treonin	T	101,11
Cystein	C	103,14
Leucin	L	113,16
Isoleucin	I	113,16
Asparagin	N	114,10
Aspartat	D	115,09
Lysin	K	128,17
Glutamin	Q	128,13
Metionin	M	131,19
Histidin	H	137,14
Fenylalanin	F	147,18
Arginin	R	156,19
Tyrosin	Y	163,18
Tryptofan	W	186,21

#### 4.5 NSE: neuron-spesifikk enolase

Enolase er et metall-aktivert metalloenzym som katalyserer dehydreringen av 2-fosfo-D-glycerat til fosfoenolpyruvat i den glykolytiske metabolismeveien, og den motsatte reaksjonen i glukoneogenesen. Tre isoenzymer er å finne i menneskekroppen og ellers i andre vertebrater; alfa, beta og gamma enolase. Alfa enolase (NNE; non-neuronal enolase) er å finne i de fleste vev i kroppen, beta enolase (MSE) er muskelspesifikk, mens gamma enolase (NSE) er neuronspesifikk. Alle kjente eukaryote enolaser er dimere, og både homo- og heterodimere enolaser kan dannes av de tre ulike subenhetene (Duncan, McAleese et al. 1992; Chai, Brewer et al. 2004). Subenhetene er proteiner som består av 433 aminosyrer, men med enkelte forskjeller i sekvensene. Dette medfører ulik molekylvekt. Alfa-enheten er 47038 Da, beta-enheten er 46856 Da, og gamma-enheten er 47137 Da stor (<http://au.expasy.org/>).



Figur 4-7: Asymmetrisk dimer av NSE (gamma-enolase) (Chai, Brewer et al. 2004)

NSE består av to gammasubenheter, og finnes i nervevev og neuroendokrine celler. I tillegg er NSE et viktig hjerneprotein; det utgjør mellom 0,4 og 2,2 % av den totale andel løselig protein i hjernen, avhengig av region. NSE har høyest aktivitet sammen med  $Mg^{2+}$  (co-faktor), og finnes i mengder som er mye større enn hva som er nødvendig for å

utføre de funksjonene vi kjenner til. Det er derfor rimelig å anta at proteinet har andre roller enn de som er oss bekjent så langt (Chai, Brewer et al. 2004). Gamma-enolase finnes i diffuse neuroendokrine systemer i lungene hvor den produseres og utskilles som et ledd i den normale funksjonen. En forhøyet serumkonsentrasjon ved cancer skyldes den økete vevsmassen og tumors infiltrerende vekst, som gjør at NSE slipper lettere over i blodbanen. Dette medfører at NSE kan benyttes som en markør for småcellet lungekreft (Paus and Myklebust 1995; Lamy, Grenier et al. 2000).

Ingen tumormarkører kan alene bekrefte eller avkrefte cancer, dette gjelder også for NSE. NSE er gjerne benyttet sammen med andre tumormarkører, da spesielt pro-gastrin-releasing peptide (pGRP), chromogranin A og carcinoembryonic antigen (CEA), som tumormarkører i forbindelse med småcellet lungekreft. Måling av serumkonsentrasjonen til disse tumormarkørene kan gi et bilde på grad av sykdom, både før og etter terapi (Bonner, Sloan et al. 2000), benyttes til diagnostisering av og prognose for SCLC (Shibayama, Ueoka et al. 2001), og til å forutsi tumorresidiv (Niho, Nishiwaki et al. 2000). Nedenfor i figur 4-8 er aminosyresekvensen til NSE presentert ved hjelp av bokstaver, hvor hver bokstav representerer en av de 20 aminosyrene. (For koding av bokstaver til aminosyrer, se kapittel 2: forkortelser, eller tabell 4.1).

SIEK IWARR EILDSR GNPTVEVDLYTAK GLFR AAVPSGASTGIYEALELR DGDK  
QR YLGK GVLK AVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEK LDNLMLELDGTENK SK  
 FGANAILGVSLAVCK AGAAER ELPLYR  
HIAQLAGNSDLILPVPAFNVINGGSHAGNK LAMQEFMILPVGAESFR DAMR  
LGAEVYHTLK GVIK DK YGK DATNVGDEGGFAPNILENSEALELVK EAIDK  
AGYTEK IVIGMDVAASEFYR DGK YDLDFK SPTDPSR YITGDQLGALYQDFVR  
DYPVVSIEDPFDQDDWAAWSK FTANVGIIQIVGDDLTVTNPK R IER AVEEK  
ACNCLLLK VNQIGSVTEAIQACK LAQENGWGMVSHR  
 SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK TGAPCR SER LAK YNQLMR IEEELGDEAR  
FAGHNFR NPSVL

Figur 4-8: Aminosyresekvensen til NSE

Figur 4-8 viser også peptidproduktene etter klipp av NSE med trypsin. Trypsin klipper etter aminosyrene lysin og arginin, disse er derfor markert med henholdsvis rød **K** (lysin) og blå **R** (arginin). I tillegg er aminosyren cystein (**C**) markert med grønn. Alle peptidprodukter som er spesifikke for NSE i forhold til alfa og beta enolase er understreket. In-silico klipp av NSE med trypsin, generert av databasen *ProteinProspector*, gir 46 produkter hvorav 28 er spesifikke for NSE, og 18 produkter er uspesifikke. Det vil si at også tryptisk klipp av alfa og beta enolase gir de samme peptidsekvensene (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfbin4.0/msdigest.cgi>). Spesifisitet i forhold til alle plasmaproteiner kommer inn senere i oppgaven. Selv om NSE inneholder 6 aminosyrer av typen cystein, er det ikke kjent i litteraturen at proteinet inneholder disulfidbroer (<http://ca.expasy.org/uniprot/P09104>).



## **4.6 Strategi**

Første del av oppgaven går ut på å finne en metode for proteolytisk klipp av NSE (se avsnitt 4.3 Proteolytisk klipp av proteiner). Deretter skal peptidproduktene etter tryptisk klipp av NSE identifiseres. Her er peptidproduktene til NSE kategorisert som spesifikke eller uspesifikke. Det understrekes at dette gjelder i forhold til alfa og beta enolase.

Videre skal de best egnede kandidatene til å representere NSE selekteres ut. Dette gjøres ved å kartlegge peptidproduktenes egenskaper. Skal man bruke ett peptid til å monitorere et protein, må peptidet være spesifikt i forhold til alle plasmaproteiner (se avsnitt 4.4.4 Proteinidentifisering ved hjelp av peptidmassemålinger). For å kunne utføre kvantitative målinger må den proteolytiske klippen være fullstendig. Det vil si at klippen når endepunkt (se avsnitt 4.3 Proteolytisk klipp av proteiner). I tillegg må peptidene som genereres ha høy signalintensitet i MS (se avsnitt 4.4.3 Massespektrometer og deteksjon av peptider). Retensjonen av peptidene på kolonnen påvirker deteksjonen. Peptider som retarderes slik at de eluerer ut i front, på samme tid eller etter lang tid, vil ekskluderes.

Til slutt skal en strategi for prøveoppbevaring av plasmaprøver utarbeides. Det vil bli tatt utgangspunkt i tidligere arbeid med proteinfelling utført på avdelingen (Winther and Reubsaet 2006). Når denne foreligger, testes LC-MS metoden for deteksjon av NSE i humant plasma på pasientprøver fra pasienter med påvist SCLC.

## 5. MATERIALER OG METODER

### 5.1 Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 5-1, 5-2, 5-3 og 5-4 viser kjemikalier, proteiner og utstyr brukt i laboratoriearbeidet til denne oppgaven.

*Tabell 5-1: Liste over kjemikalier*

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
CH <sub>3</sub> CN, acetonitril	HPLC-kvalitet	Merck, Darmstadt, Tyskland
CH <sub>3</sub> COOH, eddiksyre	Analytisk	Prolabo, Manchester, England
HCOOH, maursyre	Analytisk	Riedel-de Haën, Seelze, Tyskland
CH <sub>3</sub> OH, metanol	HPLC-kvalitet	Merk, Darmstadt, Tyskland
TEA, trietanolamin	>99%	Fluka, Buchs SG, Sveits
Ureum	100 %	NMD, Norge
DTT (1,4-ditiotreitol)	>99%	Biochemica
IAA (2-jodacetamid)	>99%	Sigma-Aldrich, Norge

Tabell 5-2: Liste over proteiner

Navn	Leverandør
NSE	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Cytokrom C	Sigma, St.Louis, MO, USA
Trypsin, fra bovin pankreas	Sigma, St.Louis, MO, USA

Tabell 5-3: Liste over utstyr til LC-MS

LC-MS		
Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	Sil-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Blandekammer	FCV-10ALVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Separasjonskolonne	BioBasic C-8	Thermo Electron corporation
Kolonne for prøveopparbeidelse	RAM	Merck, Tyskland
System controller	SCL-10AVP	Shimadzu, Kyoto, Japan
MS	LC-MS-2010 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Programvare	Class VP Chromatography Datasystem Version 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Pumper	LC-10AD VP LC7A	Shimadzu, Kyoto, Japan

Software	LCMSsolution	Shimadzu, Kyoto, Japan
Svitsj	FCV-12AH	Shimadzu, Kyoto, Japan
MS-MS	LCQ™DUO	Finnigan

Tabell 5-4: Liste over øvrig utstyr

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipetter	Finnpipette®	Labsystems, Helsinki, Finland
Inkubator ovn	Termax	Termax, Bergen, Norge
pH-meter	632 pH-meter	Metrohm, Herisau, Sveits
Sentrifuge	1200/06	Hettich Zentrifugen, Tyskland
SpeedVac, inndamping med vakum	SPD121P RVT4T04	Thermo Electron Corporation
Vannrenseanlegg	EASY Pure UV	Barnstead, Dubuque, USA
Vekt	AE200S	Metler, Greifensee, Sveits
Vortex mikser	Vibrofix VP1 electronic	Janke & Kunkel IKA-WERK, Staufen, Tyskland
VibraMax Rystemaskin	VibraMax 100	Heidolph, Tyskland

## ***5.2 Tillaging av løsninger og buffere***

### **Buffer**

TEA buffer, 0,1 M, med pH 7,3 ble laget ved å veie ut 1,4919 g flytende TEA. Dette ble fortynnet til 100 mL med ionebyttet vann i en målekolbe. pH ble regulert med 100 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

### **Trypsin-løsning**

Trypsin til bruk ved klipping (0,1 mg/mL) ble laget i TEA buffer. Det ble veid ut 1mg trypsin tørrstoff som ble løst i 1 mL 0,1 M TEA buffer med pH 7,3. Fortynningen til 0,1 mg/mL ble gjort ved å ta ut 0,1 mL og tilsette 0,9 mL buffer. Trypsin i andre konsentrasjoner ble også benyttet i oppgaven. En gitt mengde stamløsning ble da fortynnet til ønsket konsentrasjon ved å tilsette passende mengde TEA-buffer.

### **Peptid-løsning**

En NSE-løsning på 0,1 mg/mL ble laget ved å fortynne 17,86  $\mu\text{L}$  av en NSE-stamløsning på 0,56 mg/mL med 82,14  $\mu\text{L}$  0,1 M TEA buffer. Stamløsningene ble oppbevart i fryser ved  $-32^\circ\text{C}$  og ble kun tatt frem ved behov. Løsningene ble plassert i fryser straks de var ferdig benyttet. NSE-løsninger i andre konsentrasjoner ble laget ved å fortynne en gitt mengde stamløsning til ønsket konsentrasjon med TEA-buffer.

### **Mobilfaser**

- Mobilfase A

HCOOH-løsning på 20 mM ble laget ved å tilsette 755  $\mu\text{L}$  100 % HCOOH til 1 L vann.

- Mobilfase B

Mobilfase B består av 95 % ACN og 5 % mobilfase A. Det ble overført 10 mL mobilfase A til en målekolbe, og ren ACN ble fylt opp til 200 mL.

### **Reduserende agens DTT (1,4 –ditiotreitol)**

For å lage 45 mM DTT-løsning for proteinreduksjon ble følgende gjort: 6,9 mg DTT tørrstoff ble veid inn og tilsatt 1,0 mL ionebyttet vann. Bruk av hansker er nødvendig i følge HMS.

### **Alkylerende agens IAA (2-jodacetamid)**

For å lage 100 mM IAA-løsning for alkylering ble følgende gjort: en vial med 56 mg IAA ble tilsatt 3,0 mL ionebyttet vann. Løsningen ble oppbevart i et mørkt glass da stoffet er lysømfindelig. Hansker og briller ble brukt som beskyttelse mot det alkylerende reagenset. Dette i følge HMS.

### **8M urea-løsning**

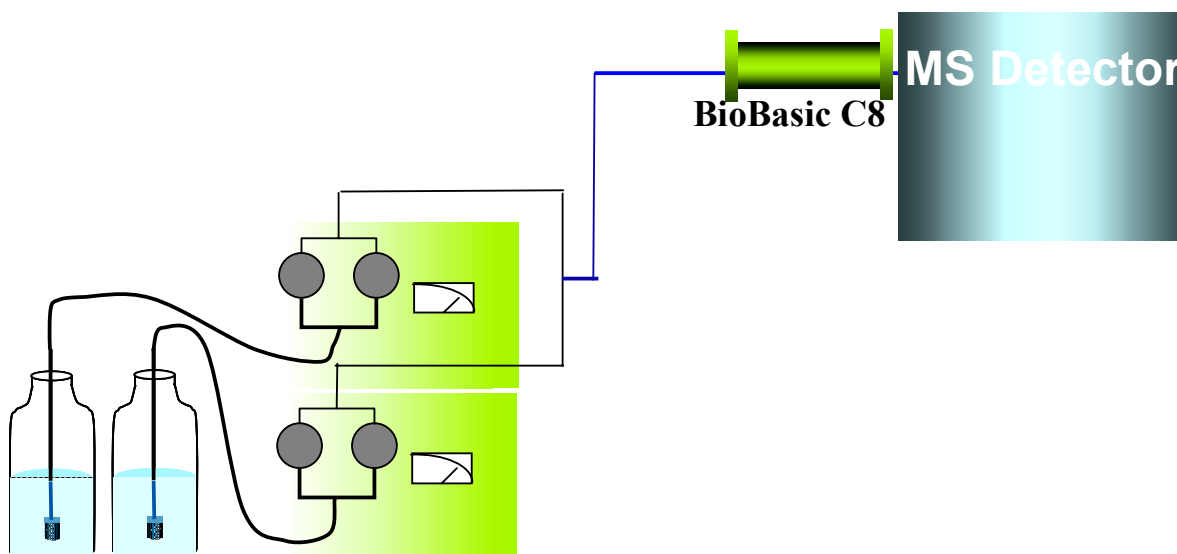
0,373 g flytende TEA ble veid inn i kolbe og tilsatt 5 mL ionebyttet vann. Et veieskip ble brukt til å veie inn 12 g urea som så ble tilsatt TEA-løsningen. Ionebyttet vann ble tilsatt til 15 mL, og pH justert med 100 % eddiksyre. Kolben ble tilslutt fylt opp med ionebyttet vann til 25 mL. Denne løsningen ble så oppbevart i kjøleskap.

### ***5.3 LC-MS for analyser av NSE i vandige prøver***

#### **5.3.1 Oppsett av LC-MS for analyser av produkter fra tryptisk klipp av NSE i vandige prøver**

For alle forsøkene ble det benyttet ESI i positive mode som ionekilde. Som forstøvergass og tørkegass ble nitrogen brukt i mengdene 1,5 L/min og 20 L/min. Kapillærtemperaturen var på 200°C og spenning over proben var på 4,5 kV. Ved deteksjon ble det brukt en enkel kvadrupol som masseanalysator. For forsøkene som omfatter verifisering av identifikasjon til enkelte peptidprodukter, ble det benyttet en ionefelle som MS-MS. Analysene ble kjørt over en BioBasic C-8 kolonne, med varierende gradienter for de ulike forsøkene nedenfor. Mobilfase A var 20 mM HCOOH, og mobilfase B bestod av 95 % ACN og 5 % 20 mM HCOOH. Flowhastigheten lå på 0,05 mL/min. Deteksjon ut fra både SIM og scan ble benyttet; dette ble variert ut fra hva som var mest gunstig for det enkelte forsøk. For alle utførte forsøk var injeksjonsvolumet 20 µL.

Instrumentene ble satt opp som vist i figur 5-1. Systemet bestod av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, kolonne og MS. Dette oppsettet ble også brukt i tilfellene for MS-MS kjøringene.



Figur 5-1: LC-MS oppsett for vandige prøver

Det ble brukt to ulike gradient-elueringer. En lang gradient (30 minutter) for å få maksimal informasjon angående de tryptiske klipp av NSE (se tabell 5-5), og en kortere gradient (20 minutter) for de kvantitative målingene som ble utført på bestemte  $m/z$  verdier i SIM mode (se tabell 5-6).

Tabell 5-5: Gradient-tabell for 30 minutter gradient 5-60 %, flow 0,05 mL/min

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
1	95	5
30	40	60
34,9	40	60
35	0	100
35,9	0	100
36	95	5
41	95	5



Tabell 5-6: Gradient-tabell for 20 minutter gradient 5-41 %, flow 0,05 mL/min

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
1	95	5
20	59	41
24,9	59	41
25	0	100
25,9	0	100
26	95	5
40	95	5

Anmerkning: under deler av rekondisjoneringen (tid = 26 til 36 minutter), ble flowen skrudd opp fra 0,05 mL/min til 0,1 mL/min.

### 5.3.2 Metoder for tryptisk klipp av NSE i vandige prøver

#### Tryptisk klipp

For å lage en proteinløsning med NSE i konsentrasjon 20 µg/ml ble 20 µL NSE i konsentrasjon 0,1 mg/mL tilsatt 80 µL TEA. Trypsin i konsentrasjon 1 mg/ml ble tilsatt i mengde 1 µL til proteinløsning (protease:protein ratio 1:20). Dette ble satt i varmeskap ved 37°C over natt. Inkuberingstiden ble variert for eksperimentene for produktdannelse over tid. Klippen ble stoppet enten ved frysing av prøvene eller ved å senke pH til rundt 2-3.

#### Reduksjon og alkylering

I noen innledende forsøk ble prøvene redusert og alkylert. Da ble 10 µL proteinløsning tilsatt 10 µL TEA og 5 µL 45 mM DTT. Løsningen ble så inkubert i 20 minutter ved 50°C, før den ble avkjølt til romtemperatur. IAA på 100 mM ble deretter tilsatt i mengde 5 µL, og løsningen ble satt til inkubering i 15 minutter ved romtemperatur. Tilslutt ble 480 µL TEA tilsatt, i tillegg til 10 µL 0,1 µg/µL trypsin med påfølgende inkubering i

varmeskap ved 37 °C over natt. IAA skal behandles i mørket, og hansker og munnbind skal brukes når det jobbes med alkylende agens.

### Denaturering, reduksjon og alkylering

Forsøk ble også utført med denaturering etterfulgt av reduksjon og alkylering. Her ble proteinløsningen denaturert i 8 M urea, og så justert til 2 M urea (for at trypsin skal kunne klippe). Reduksjon og alkylering, med påfølgende tryptisk klipp, som vist ovenfor.

### Cytokrom C

For hele tiden å ha en verifikasjon på at tryptisk klipp var gått, ble det tilsatt cytokrom C til prøvene. Dette proteinet har velkjente peptidprodukter som følge av klipping med trypsin. Disse ble observert og registrert som markører for vellykket klipp. Cytokrom C ble tilsatt i forhold 1:4 til NSE, da dette vil gi likt antall mol av de to proteinene i løsning.

### Produktdannelse over tid

For forsøkene som innbefattet monitorering av produktdannelse over tid, ble flere forsøk utført. Varierende parametere for de ulike forsøkene var proteinkonsentrasjoner, tidsintervallene og tidspunkt for prøveuttakning. Se tabell 5-7.

*Tabell 5-7: Variable parametere i forsøkene for monitorering av peptidprodukter over tid*

Konsentrasjoner	Tidsintervaller	Tidspunkt for prøveuttak
20 µg/ml	0 – 6 timer	Tid = 0,1,2,3,4,5,6
20 µg/ml	0 – 12 timer	Tid = 0,1,2,3,6,9,12
8 µg/ml	0 – 24 timer	Tid = 0,1,2,3,6,9,12,18,24
20 µg/ml		Tid = 0,1,2,3,6,9,12,20,24
40 µg/ml		
20 µg/ml	0 – 30 timer	Tid = 0,1,2,3,6,9,12,24,30
40 µg/ml		

### 5.3.3 Deteksjon av peptider

Dataene fra en in-silico NSE digest generert av databasen *ProteinProspector* (<http://prospector.ucsf.edu/>) ble benyttet for å gjenkjenne de ulike m/z til peptidene som skulle identifiseres. m/z verdier for en, to og tre ganger ladede peptid-ioner (monoisotope masser) til de spesifikke (tabell 5-8) og uspesifikke (tabell 5-9) peptidproduktene er vist på henholdsvis denne siden og side 44.

Tabell 5-8: m/z verdier for spesifikke peptidprodukter fra tryptisk klipp av NSE

Aminosyre nr	Sekvens	[m+H] <sup>1+</sup>	[m+2H] <sup>2+</sup>	[m+3H] <sup>3+</sup>
1-4	<i>SIEK</i>	476,3	238,6	159,4
5-8	<i>IWAR</i>	545,3	273,2	182,4
54-55	<i>QR</i>	303,2	152,1	101,7
64-88	<i>AVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEK</i>	2578,4	1289,7	860,1
89-102	<i>LDNLMLELDGTENK</i>	1604,8	802,9	535,6
120-125	<i>AGAAER</i>	574,3	287,7	192,1
126-131	<i>ELPLYR</i>	790,4	395,7	264,2
132-161	<i>HIAQLAGNSDLILPVPAFNVINGGSHAGNK</i>	3024,60	1512,8	1008,9
162-178	<i>LAMQEFMILPVGAESFR</i>	1939,0	970,0	647,0
179-182	<i>DAMR</i>	492,22	246,6	164,7
183-192	<i>LGAEVYHTLK</i>	1130,6	565,8	377,5
197-198	<i>DK</i>	262,1	131,6	
202-227	<i>DANVGDEGGFAPNILENSEALELVK</i>	2702,3	1351,7	901,4
228-232	<i>EAIDK</i>	575,3	288,2	192,4
233-238	<i>AGYTEK</i>	668,3	334,7	223,4
239-252	<i>IVIGMDVAASEFYR</i>	1570,8	785,9	524,3
253-255	<i>DGK</i>	319,2	160,1	
262-268	<i>SPTDPSR</i>	759,4	380,2	253,8
269-284	<i>YITGDQLGALYQDFVR</i>	1858,9	930,0	620,3
285-305	<i>DYPVVSIEDPFDQDDWAAWSK</i>	2483,1	1242,0	828,4
306-325	<i>FTANVGIIQIVGDDLTVTNPK</i>	2102,1	1051,6	701,4
327-329	<i>IER</i>	417,2	209,1	
330-334	<i>AVEEK</i>	575,3	288,2	
343-357	<i>VNQIGSVTEAIQACK</i>	1617,8	809,4	539,9
358-371	<i>LAQENGWGVMSHR</i>	1583,8	792,4	528,6
412-421	<i>IEEELGDEAR</i>	1160,5	580,8	387,5
422-428	<i>FAGHNFR</i>	848,4	424,7	283,5
429-433	<i>NPSVL</i>	529,3	265,2	

Tabell 5-9: *m/z* verdier for uspesifikke peptidprodukter fra tryptisk klipp av NSE

Aminosyre nr	Sekvens	$[m+H]^1+$	$[m+2H]^2+$	$[m+3H]^3+$
9-14	<i>EILDSR</i>	732,4	366,7	
15-27	<i>GNPTVEVDLYTAK</i>		703,9	469,6
28-31	<i>GLFR</i>	492,3	246,7	
32-49	<i>AAVPSGASTGIYEALRL</i>	1804,9	903,0	602,3
50-53	<i>DGDK</i>	434,2	217,6	
56-59	<i>YLGK</i>	480,3	240,6	
60-63	<i>GVLK</i>	416,3	208,6	
103-104	<i>SK</i>			
105-119	<i>FGANAILGVSLAVCK</i>		739,9	488,3
193-196	<i>GVIK</i>	416,3	208,6	
199-201	<i>YGK</i>			
326	<i>R</i>			
335-342	<i>ACNCLLLK</i>	877,5	439,2	
372-393	<i>SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK</i>	766,0 <sup>+3</sup>	574,8 <sup>+4</sup>	460,1 <sup>+5</sup>
394-399	<i>TGAPCR</i>	604,3	302,6	
406-411	<i>YNQLMR</i>	824,4	417,7	

For identifisering av peptidprodukter, ble det først kjørt scan mode som deteksjon, og deretter SIM. Da ikke alle produktene var synlige i scan mode, ble det lagt inn SIM verdier for å øke følsomheten til deteksjonen. Når det gjaldt forsøkene som innbefattet forberedelser til prøveopparbeidelse, og analyse av plasmaprøver, ble det søkt etter de utvalgte peptidproduktene i SIM mode. For å spare MS for mest mulig forurensninger ble det etter hvert gjort slik at MS ikke ble slått på før etter de første fem minuttene av analysen (hvor fronten eluerer ut). Spesielt viktig var dette for plasmaprøvene. MS var alltid slått av under siste del av analysene som var vasking av kolonne med 100 % ACN, og rekondisjonering.

### 5.3.4 Kontroll av peptiders spesifisitet

Databaser på internett inneholder store bibliotek over alle kjente proteiner i kroppen og disse proteinenes aminosyresekvenser. Matching av de spesifikke peptidproduktene til NSE mot databasene ble fortatt for å sikre fullstendig spesifisitet. Databasene som ble benyttet var *Bioanalytical Research Group*: <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html> og verktøyet som ble valgt var PeptideSearch. Dette er et verktøy for søk i databaser på grunnlag av massespektrometerdata som peptidmasser eller partielle aminosyresekvenser. For denne oppgaven ble sistnevnte valgt. Her ble proteinidentifisering på grunnlag av aminosyresekvensen utført. Organisme måtte spesifiseres, her ble selvfølgelig ”menneske” (human) valgt.

### 5.3.5: Prøveopparbeidelse: Felling av NSE i vandige prøver med ACN som fellingsreagens

Plasma er en svak gulfarget, litt klebrig og svakt alkalisk væske med pH 7,4. Proteiner utgjør 7-8 % av plasma, mens salter og glukose utgjør henholdsvis ca 0,9 % og 0,1 %. Andre komponenter som forekommer i enda mindre mengder er fett, aminosyrer, urinstoff og gallestoffer.

Hvis plasma injiseres i et normalt HPLC system, vil plasmaproteinene felles ut, tette til kolonnen og ødelegge separasjonssystemet. Den enkleste prøveopparbeidelsen som forhindrer dette er å fjerne proteinene fra plasmaprøven ved utfelling. Utfordringen her vil være å felle mest mulig plasmaproteiner, men ikke felle NSE.

Det er flere reagenser som kan tilsettes plasma eller serum for å felle proteinene. Disse reagensene kan deles inn i fire typer:

- Syrer som trikloreddiksyre og perklorisyre
- Organiske løsemidler som er blandbare med vann slik som metanol og avetonitril (ACN)

- Basiske løsninger kombinert med metallsalter slik som natriumhydroksyd tilsatt sinksulfat
- Mettede saltløsninger slik som mettet ammoniumsulfat.

Av disse er syrer, ACN og metanol er mest brukt. Tidligere arbeid som er gjort med plasmaprøver og deteksjon av peptider har benyttet ACN som fellingsreagens (Winther and Reubsaet 2006). Det vil derfor være aktuelt å tenke på proteinfelling ved bruk av ACN som en metode for prøveopparbeidelse av plasmaprøvene i siste del av oppgaven. I tillegg vil bruk av RAM-kolonne stå for en del av prøveopparbeidelsen før løsningen når separasjonskolonnen (Rasmussen 2002).

*Tabell 5-10: Felling av NSE i vandige prøver med ACN*

Prøve nr	TEA (µL)	NSE 0,56 µg/µL (µL)	ACN (%)	ACN (µL)	Totalt volum etter felling (µL)	Supernatant som tas av: (µL)	TEA til reløsing (µL)	Trypsin 0,01 mg/mL til klipp (µL)
1	96,4	3,6	20	25	125	112,5	50	5
2	96,4	3,6	33,33	50	150	135	50	5
3	96,4	3,6	50	100	200	180	50	5
4	96,4	3,6	66,66	200	300	270	50	5
5	96,4	3,6	75	300	400	360	50	5
6	96,4	3,6	0	0	100	90	50	5

Prosedyren for felling av protein med kald ACN er som følger:

1. Kald ACN ble tilsatt i langsomt tempo dråpevis til løsningen, under omristing på VibraMax.
2. Prøverørene med løsning ble rystet i ca 10 minutter.
3. Sentrifugering på maksimal hastighet i minimum 10 minutter.
4. 90 % av supernatanten ble sugd av og overført til nye prøverør.
5. All væske ble dampet av i SpeedVac ved 35 °C. Tiden for inndamping ble variert avhengig av væskemengde. Lys og ekstra varme ble ikke brukt. Bunnfallet etter fjerning av supernatant ble også dampet inn.

6. Proteinresten etter inndamping ble reløst i TEA. Det samme ble bunnfallet som var igjen etter fellingen.
7. Prøvene ble tilsatt trypsin, og satt til tryptisk klipp over natt.
8. Relativ mengde protein i både prøvene fra supernatanten og fra bunnfallet ble analysert.

## ***5.4 LC-MS for analyser av NSE i plasmaprøver***

### **5.4.1 RAM: Restricted Access Media og kolonnesvitsjing**

Injeksjon av plasmaprøver direkte eller etter proteinfelling på RAM-kolonner i kombinasjon med kolonnesvitsjing, er i dag en mye brukt prosedyre som kan inkludere både prøveopparbeidelse og oppkonsentrering av analytt. Dette er et system som åpner for separasjon av komponentene i en prøve via en kombinasjon av eksklusjon på grunnlag av størrelse, og konvensjonell fasefordeling. Den ytre fasen i en RAM-kolonne benytter eksklusjon på grunnlag av størrelse for å forhindre store biomolekyler/proteiner fra å trenge inn i det innerste laget. I tillegg er overflaten hydrofil og absorberer dermed ikke proteiner. Som et resultat av dette, eluerer disse komponentene ut av kolonnen, og i avfall (figur 5-3). Porestørrelsen på 5,2  $\mu\text{m}$  ekskluderer store proteiner. Små molekyler, derimot, trenger gjennom til den indre overflaten hvor de retarderes og separeres av et omvendt fase materiale ved hydrofobe interaksjoner (Jarmalaviciene, Kornysova et al. 2003; Cassiano, Lima et al. 2006).

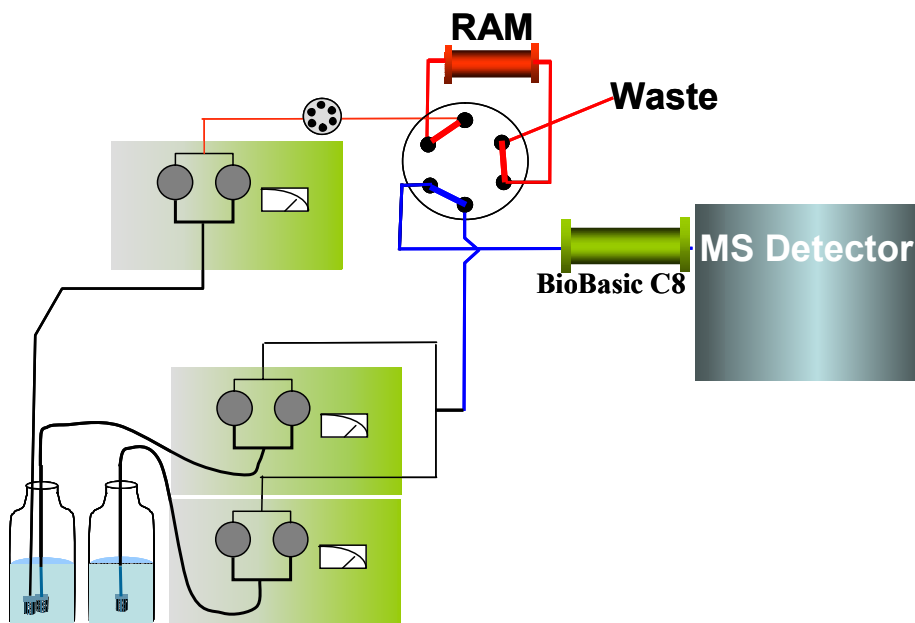
Vanlig benyttede teknikker innen HPLC for direkte injeksjon av lite eller ikke opparbeidede plasmaprøver, involverer to kolonner som separeres av et svitsje-kammer. Den første kolonnen (for dette oppsettet), RAM-kolonnen, retarderer små peptider og ekskluderer store proteiner fra prøven. Proteinene elueres sammen med void volume via svitsjekammeret til avfall. Kammeret svitsjes så til den andre kolonnen, analysekolonnen, og de små peptidene elueres fra RAM-kolonnen til analysekolonnen for videre kromatografering, med en sterkere eluent. Avhengig av flush-retningen vil de ulike retningene som eluentene styres i, kalles foreflush eller backflush. Dette avhenger også av instrumentoppsettet. I tilfellet for denne oppgaven vil elueringen av peptider fra RAM-kolonnen til analysekolonnen være back-flush (Jarmalaviciene, Kornysova et al. 2003).



#### **5.4.2 Oppsett av LC-MS for analyser av produkter fra tryptisk klipp av NSE i plasmaprøver**

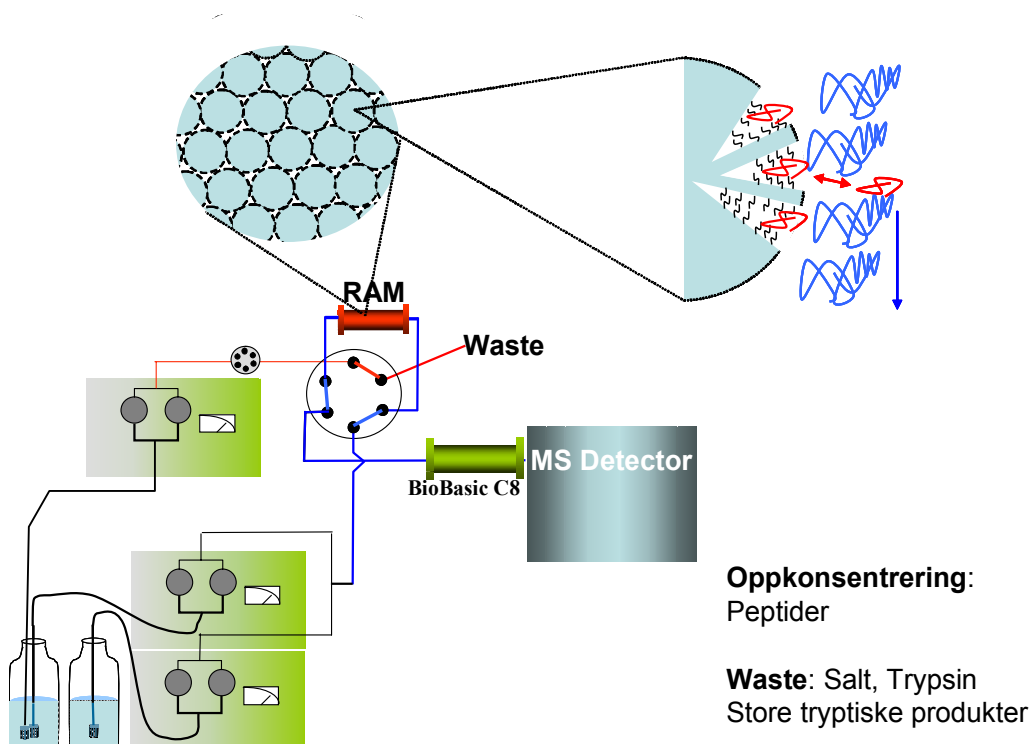
Her ble de samme betingelsene for oppsett av LC-MS som nevnt i 5.3.1 brukt. I tillegg inkluderte systemet en C-8 RAM-kolonne og svitsj.

Instrumentene ble satt opp som vist i figur 5-2 og 5-3. Systemet bestod av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, RAM-kolonne, svitsj, analysekolonne og MS. Figur 5-2 og 5-3 viser også hvordan systemet benytter svitsjen i ulike posisjoner ettersom hvor prøven skal føres. Figur 5-2 viser svitsjen i posisjon 0. Her settes prøven på RAM-kolonnen; kun små peptider retarderes mens større tryptiske produkter, salter og trypsin ledes til avfall. Figur 5-3 viser posisjon 1 hvor backflushing tar med seg de retarderte peptidene til analysekolonnen.



Figur 5-2: Oppsett av LC-MS med RAM-kolonne for analyse av plasmaprøver.

Posisjon 0



Figur 5-3: Oppsett av LC-MS med RAM-kolonne for analyse av plasmaprøver.

Posisjon 1

Analysene av plasmaprøvene ble kjørt med et gradientprogram egnet for analyse av peptider i plasmaprøver som vist i tabell 5-11.

*Tabell 5-11: Gradient-tabell for RAM*

Tid (min)	Flow-hastighet (mL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Svitsj-posisjon
1	0,08	95	5	0
12,20	0,05	95	5	0
14	0,05	95	5	0
29	0,05	60	40	1
34	0,05	60	40	1
43	0,05	40	60	1
43,10	0,05	0	100	1
44,5	0,05	0	100	0
45	0,08	0	100	0
45,5	0,08	95	5	0
59,5	0,05	95	5	0

#### 5.4.3 Prøveopparbeidelse: Felling av NSE og plasmaproteiner med ACN

Etter at en fellingsprofil ble kartlagt for felling av NSE i vandige prøver, ble et liknende forsøk gjort med plasmaprøver spiket med NSE. Dette for å se om fellingen av NSE ble påvirket av plasmaproteinene, og deretter finne den optimale mengden ACN for videre bruk i prosedyren for prøveopparbeidelse.

Tabell 5-12: Felling av plasmaproteiner og NSE med ACN

Prøve nr	Plasma (µL)	NSE 0,5 mg/mL (µL)	ACN (%)	ACN (µL)	Totalt volum etter felling (µL)	Supernatant som tas av:	TEA til reløsing (µL)	Trypsin 10 mg/mL til klipp (µL)
1	184	16	20	50		250	200	2
2	184	16	30	85,7		285,7	200	2
3	184	16	40	133,33	200	333,33	200	2
4	184	16	50	200		400	200	2
5	184	16	60	300		500	200	2
6	184	16	70	466,66		666,66	200	2
7	184	16	80	800		1000	200	2
8	184	16	90	1800		2000	200	2

Prosedyre for felling av proteiner i plasmaprøve som del av prøveoppbeidelse:

1. Kald ACN ble tilsatt i langsomt tempo dråpevis til plasmaprøven, under omristing på VibraMax.
2. Prøverørene med løsning ble rystet i ca 10 minutter, til tydelig klar supernatant med granulater på bunn.
3. Sentrifugering på maksimal hastighet i minimum 10 minutter.
4. 80 % av supernatanten ble sugd av og overført til nye prøverør. Grunnet ulike totaltvolum ble en gitt prosent tatt av i stedet for dekantering av prøvene. På denne måten ble det holdt kontroll med like forhold for NSE.
5. All væske ble dampet av i SpeedVac ved 35 °C. Tiden for inndamping ble variert avhengig av væskemengde.
6. Inndampningsresten ble reløst i TEA.
7. Prøvene ble tilsatt trypsin, og satt til tryptisk klipp over natt.

## 6. RESULTATER OG DISKUSJON

### 6.1 Innledende forsøk

De innledende forsøkene ble gjort for å finne en egnet måte å klippe opp NSE på, for så kunne kromatografere peptidproduktene etter klippen.

#### 6.1.1 Direkte kromatografering av NSE

Muligheten for å kunne detektere NSE som intakt protein er i utgangspunktet til stede. Hvis proteinet blir tilstrekkelig mange ganger ladet vil  $m/z$  verdiene komme innenfor vinduet som MS håndterer, det vil si under 2000 Da. Dette til tross for at molekylmassen til proteinet er langt større. Et massespektrum til et protein består av en fordeling av ulike søyler som representerer den samme massen. Etter å ha analysert en prøve med uklippet NSE ble det lett etter det karakteristiske distribusjonsmønsteret som proteiner vil gi. Dette ble ikke funnet.

#### 6.1.2 Tryptisk klipp i vandige prøver

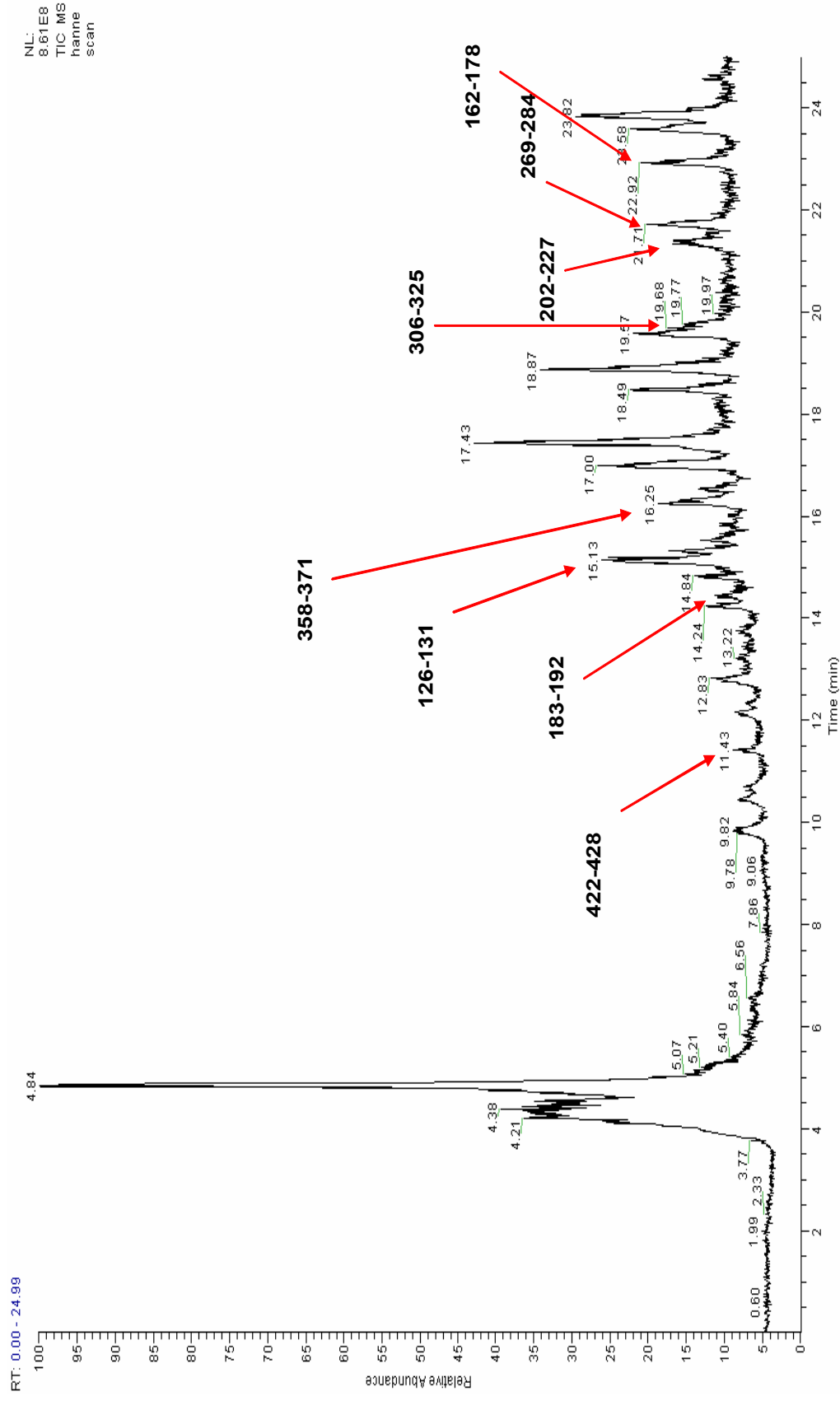
Utgangspunktet for videre analyser av NSE var basert på at proteinet måtte klippes opp av en egnet protease. I følge litteraturen er trypsin et godt valg, og denne ble derfor forsøkt. Etter å ha variert konsentrasjonen av protein i løsning ble det konkludert med at NSE i 20  $\mu\text{g/mL}$  var godt egnet som konsentrasjon når injeksjonsvolumet var på 20  $\mu\text{L}$ . Etter sammenlikning med data fra databasen *ProteinProspector* (<http://prospector.ucsf.edu/>) ble det gjenkjent flere produkter i massespekteret som matchet med dataene fra in-silico klippen. Her i blant fantes det mange produkter hvor trypsin hadde klippet peptidene fullstendig, men også noen ufullstendige peptidprodukter

som inneholdt både to og tre "miss" ("miss": produktet inneholder én eller flere lysin eller arginin etter klippingen). Disse gjenkjennes også i *ProteinProspector*.

I følge litteraturen burde ikke NSE inneholde disulfid-broer, til tross for at proteinet har 6 aminosyrer av typen cystein i kjeden. Denaturering, reduksjon og alkylering for spalting av eventuelle disulfid-broer ble likevel forsøkt for å se om dette førte til en mer fullstendig klipping av proteinet. Det ble da observert færre produkter i forhold til forsøket med enkel tryptisk klipp uten reduksjon og alkylering. Dette stemte godt overens med hva som var funnet i litteraturen om at NSE ikke inneholder disulfid-broer. Det ekstra behandlingstrinnet som ble lagt til opparbeidelsen av prøven, og det faktum at flere reagenser ble lagt til, forklarer den økte støyen som forstyrret deteksjonen, som dermed ga lavere intensitet og færre observerte produkter.

Ettersom den enkle tryptiske klippen så ut til å fungere godt ble det bestemt å starte kartleggingen av peptidproduktene til NSE så langt dette var mulig før ytterligere trinn for å forbedre klippen ble lagt til.

Figur 6-1 viser et kromatogram av tryptisk klippet NSE. Ut fra  $m/z$  verdiene funnet ble det lagd ionekromatogrammer basert på in-silico genererte data for peptidproduktene etter tryptisk klipp av NSE (figur 6-2, 6-3 og 6-4). Fremst i kromatogrammet i figur 6-1 sees en stor front. MS-deteksjonen ble etter hvert satt i gang fem minutter ut i analysen for å spare MS for forurensningene som fronten utsetter den for.



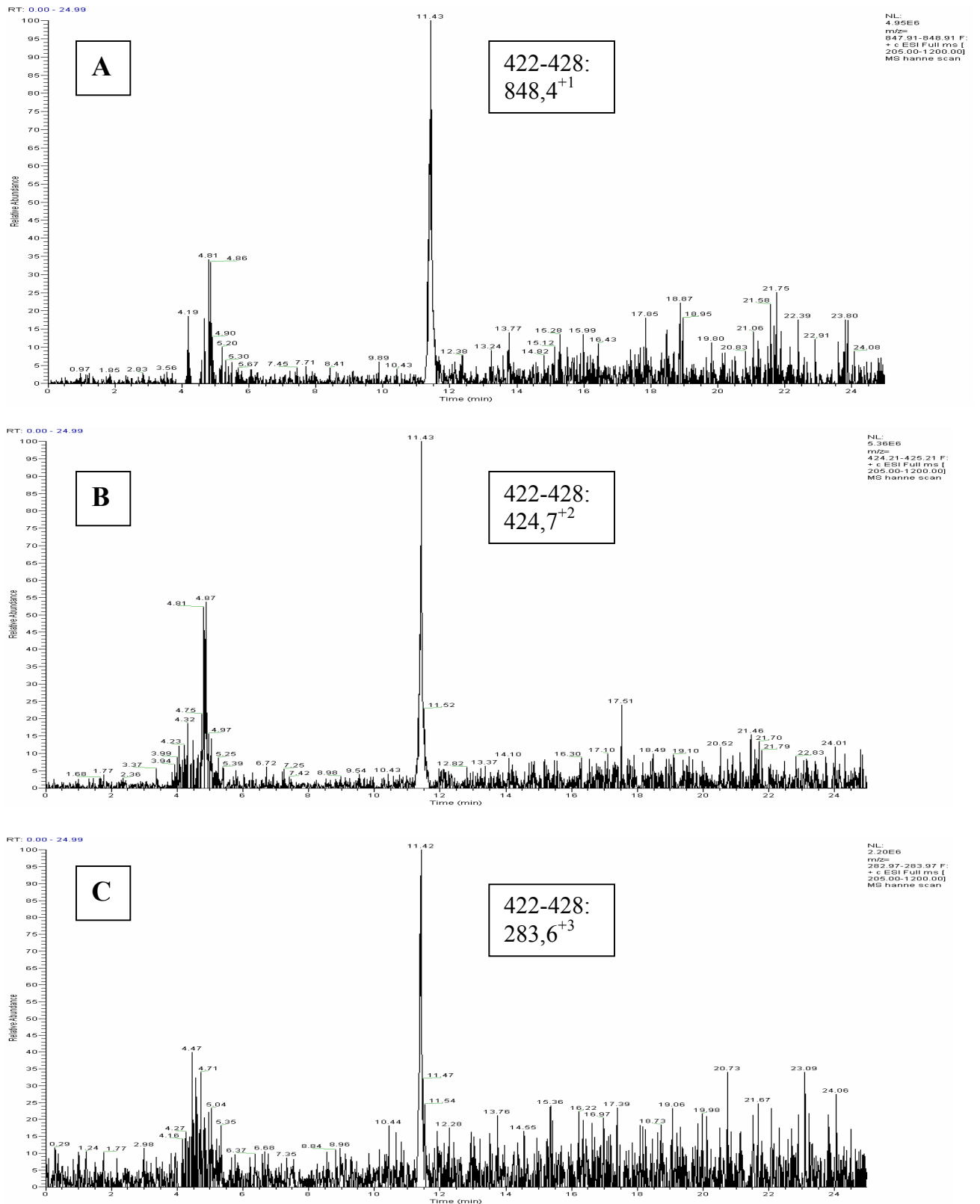
Figur 6-1: Kromatogram av tryptisk klippet NSE. 8 peptider er markert med pil

### 6.1.3 Kartlegging av spesifikke peptidprodukter

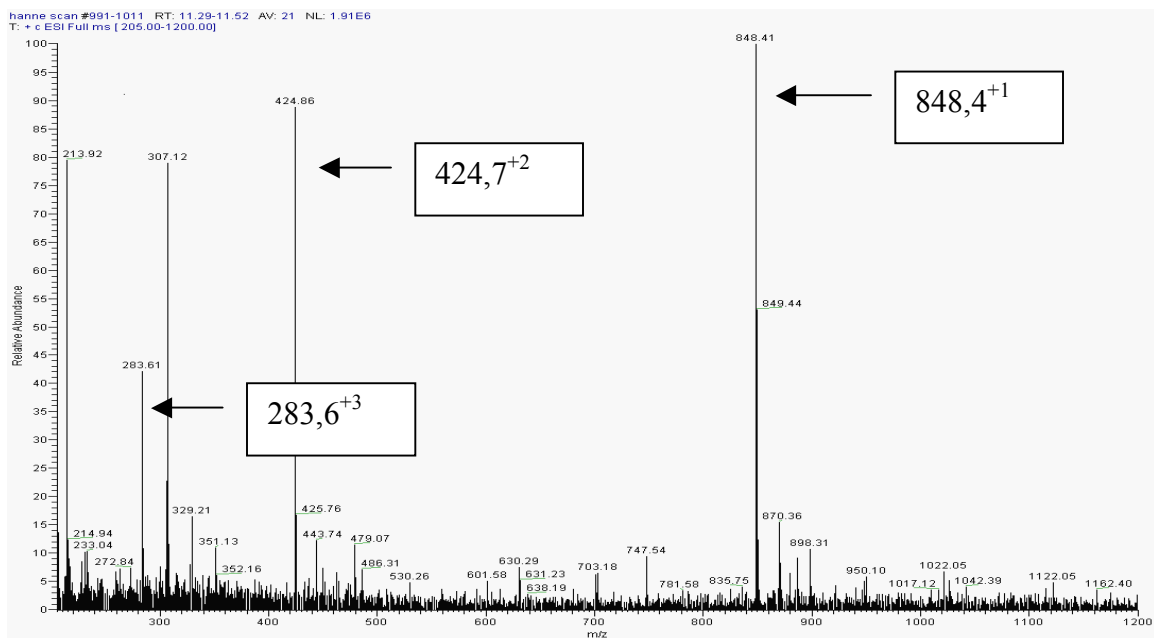
For å kunne bruke LC-MS som analysemetode for NSE, er det viktig å kjenne proteinet og peptidproduktene etter tryptisk klipp best mulig. Det optimale ville vært å finne igjen alle disse produktene, både de som er spesifikke for NSE og de uspesifikke, i et kromatogram etter analyse. Dette ville gitt et fullstendig kart hvor alle peptidene var identifisert med tilhørende relative retensjonstider. Fokus var på de spesifikke produktene. Identifiseringen ble basert på å finne topper i kromatogrammene for  $m/z$  verdier for ulike ladningsforhold ved samme retensjonstid. Mange av peptidene som ble identifisert på denne måten ble i tillegg verifisert ved hjelp av MS-MS, som beskrevet lengre ned i oppgaven. Eventuelle auto-digest produkter av trypsin ble matchet mot peptidproduktene fra klipp av NSE. Ingen av de identifiserte spesifikke produktene hadde samme aminosyresekvens som produktene fra auto-digest av trypsin.

Figur 6-2 (A, B og C) viser ioneuttrekk for følgende  $m/z$  verdier tilhørende peptidsekvens 422-428 i NSE:  $848,4^{+1}$ ,  $424,9^{+2}$  og  $283,6^{+3}$ . Ioneuttrekket er tatt fra kromatogrammet som er vist i figur 6-1. Her ser vi at alle  $m/z$  verdiene gir topp ved tid lik 11,43 minutter. Figur 6-3 viser massespekteret til toppen ved tid lik 11,43 minutter i scanet som vist i figur 6-1. Her fremgår det tydelig at alle de tre ionene med en, to og tre ladninger er hovedbestanddeler i toppen. Det konkluderes dermed med at peptid 422-428 faktisk er peptidet som eluerer ut ved tid lik 11,43 minutter. Dette bekreftes med MS-MS ut fra fragmenteringsmønsteret som vist i figur 6-4. Her er alle b- og y-ionene som matchet med in-silicodata for sekvensen til peptid 422-428 fremhevet. Enkelte andre ioner (blant annet a-ioner og y –  $\text{NH}_3$ -ioner) ble også funnet igjen, men disse hadde så lave intensiteter at de var vanskelige å merke av.

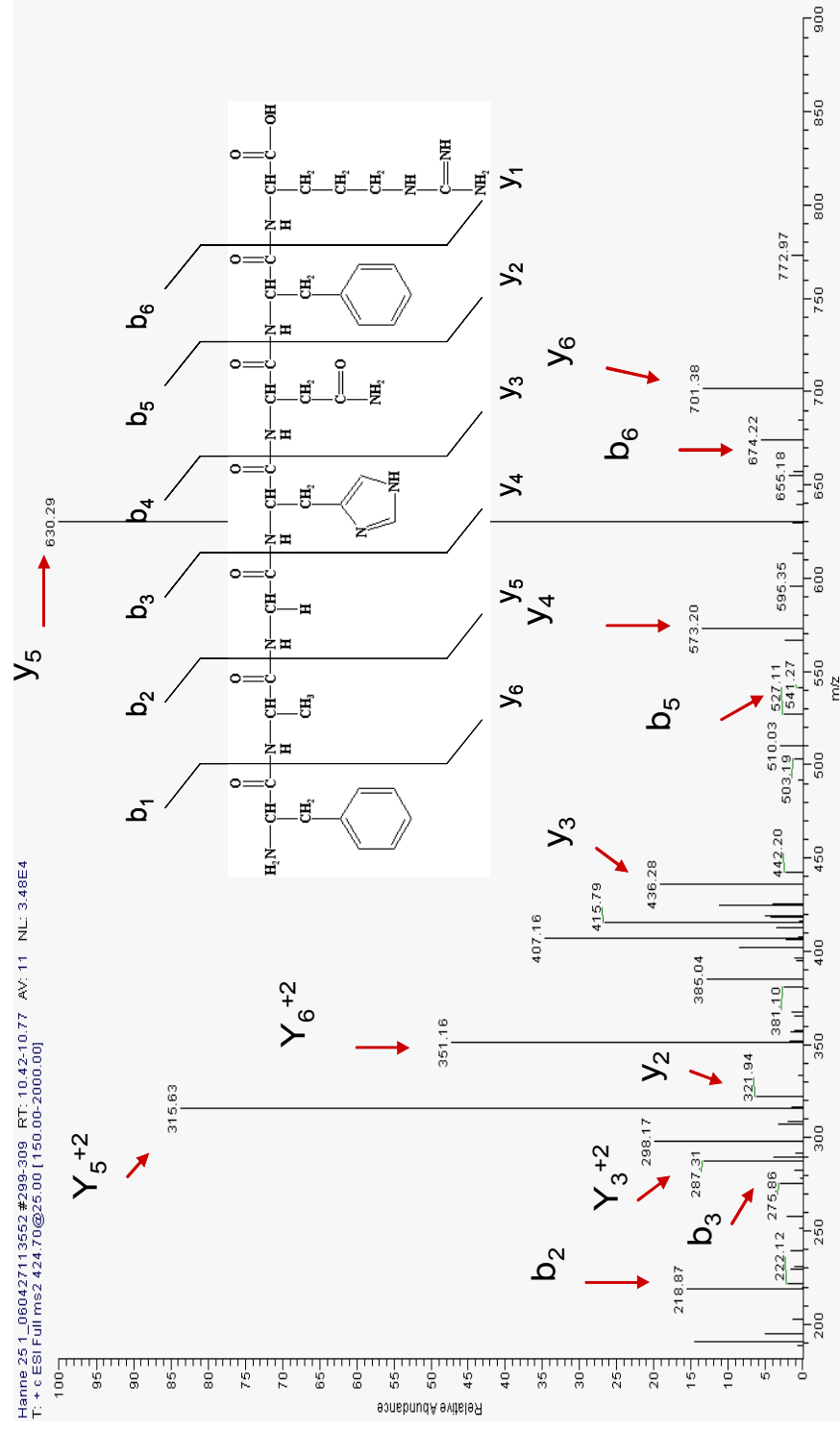




Figur 6-2: Ionekromatogram for  $m/z$  verdi (A) 848,4 ( $\pm 0,5$  Da) (B) 424,7 ( $\pm 0,5$  Da) (C) 283,6 ( $\pm 0,5$  Da). Ved tid lik 11,43 minutter sees det i alle tre ionekromatogrammene en tydelig topp som skal være peptidsekvens 422-428 i NSE



Figur 6-3: Massespekteret til peptidet som eluerer ut ved tid lik 11,43 minutter. Her vises en, to og tre ganger ladede ioner for peptidsekvens 422-428 i NSE



Figur 6-4: Øverst vises peptidet 422-428 i NSE og fragmenteringen. Nedenfor er fragmenteringsmønstret til samme peptidsekvens efter kollisionsindusert fragmentering i MS-MS. b og y-ionene er fremhevet

Denne identifikasjonsstrategien ble fulgt for alle andre peptider.

Tabell 6-1 viser oversikt over de spesifikke peptidproduktene (med mer enn 3 aminosyrer i kjeden) som ble identifisert. Korte peptider (med mindre enn 4 aminosyrer i kjeden) vil ha så kort elueringstid at de vil eluere i front, i tillegg til at de får så lave  $m/z$  verdier at MS ikke vil være i stand til detektere disse.

Tabell 6-1: Oversikt over identifiserte spesifikke peptidproduktene etter klipp av NSE med trypsin

Aminosyre nr	Sekvens	[m+H] <sup>1+</sup>	[m+2H] <sup>2+</sup>	[m+3H] <sup>3+</sup>	ID verifisert av MS-MS
5-8	<i>IWAR</i> t <sub>r</sub> (retensjonstid i minutter)	545,3 7,21	273,2 7,21	182,4	Ja
64-88	<i>AVDHINSTIAPALISSGLSVVEQEK</i> t <sub>r</sub>	2578,4	1289,7 18,19	860,1 18,19	
89-102	<i>LDNLMLELDGTENK</i> t <sub>r</sub>	1604,8	802,9 15,72	535,6 15,72	
126-131	<i>ELPLYR</i> t <sub>r</sub>	790,4 11,32	395,7 11,32	264,2	Ja
132-161	<i>HIAQLAGNSDLILPVPFNVINGGSHAGNK</i> t <sub>r</sub>	3024,6	1512,8 18,36	1008,9 18,36	Ja
162-178	<i>LAMQEFMILPVGAESEFR</i> t <sub>r</sub>	1939,0	970,0 19,86	647,0 19,86	
179-182	<i>DAMR</i> t <sub>r</sub>	492,2 9,68	246,6 9,68	164,7	
183-192	<i>LGAEVYHTLK</i> t <sub>r</sub>	1130,6 10,54	565,8 10,54	377,5 10,54	Ja
202-227	<i>DANVGDEGGFAPNILENSEALELVK</i> t <sub>r</sub>	2702,3	1351,7 18,16	901,4 18,16	
239-252	<i>IVIGMDVAASEFYR</i> t <sub>r</sub>	1570,8	785,9 16,46	524,3 16,46	
269-284	<i>YITGDQLGALYQDFVR</i> t <sub>r</sub>	1858,9	930,0 18,36	620,3 18,36	Ja
306-325	<i>FTANVGIIQIVGDDLTVTNPK</i> t <sub>r</sub>	2102,1	1051,6 16,43	701,4 16,43	
330-334	<i>AVEEK</i> t <sub>r</sub>	575,3 15,67	288,2 15,67		
343-357	<i>VNQIGSVTEAIQACK</i> t <sub>r</sub>	1617,8	809,4 16,74	539,9 16,74	
358-371	<i>LAQENGWGVMSHR</i> t <sub>r</sub>	1583,8	792,4 13,08	528,6 13,08	Ja
412-421	<i>IEEELGDEAR</i> t <sub>r</sub>	1160,5	580,8 9,88	387,5 9,88	
422-428	<i>FAGHNFR</i> t <sub>r</sub>	848,4	424,7 7,88	283,5 7,88	Ja

Tabell 6-2: Oversikt over identifiserte uspesifikke peptidproduktene etter klipp av NSE med trypsin

Aminosyre nr	Sekvens	$[m+H]^1+$	$[m+2H]^2+$	$[m+3H]^3+$
9-14	<i>EILDSR</i> $t_r$ (retensjonstid i minutter)	732,4 7,22	366,7 7,22	
15-27	<i>GNPTVEVDLYTAK</i> $t_r$		703,9 13,51	469,6 13,51
28-31	<i>GLFR</i> $t_r$	492,3 10,13	246,7 10,13	
335-342	<i>ACNCLLLK</i> $t_r$	877,5 14,44	439,2 14,44	
372-393	<i>SGETEDTFIADLVVGLCTGQIK</i> $t_r$	766,0 <sup>+3</sup> 16,26	574,8 <sup>+4</sup> 16,26	460,0 <sup>+5</sup> 16,26
406-411	<i>YNQLMR</i> $t_r$	824,4 9,36	417,7 9,36	

For de sekvensene som ikke lot seg detektere, kan dette skyldes foldingen til proteinet og innvirkningen dette kan ha på den tryptiske klippet. Eventuelt kan peptidene ha lav ioniserbarhet i ESI. Sekvensene som ligger godt ”beskyttet” innerst i de mest hydrofobe delene av NSE, kan være mindre tilgjengelige for trypsin. Dette forringer klippet. Disse peptidene detekteres dermed i mindre grad, eller ikke i det hele tatt.

Ikke alle peptid-identifikasjonene ble verifisert ved hjelp av MS-MS. Dette kan skyldes at noen av peptidene muligens forekommer med kun én ladning. Når peptider fragmenterer blir både et b-ion og det korresponderende y-ionet dannet. Når én gang ladede ioner fragmenterer, vil enten et b-ion eller et y-ion dannes. Den andre halvdelen av peptidet mistes som et nøytralt fragment. Ved flere ganger ladede peptider får man gjerne ladninger på begge fragmentene og disse vil dermed være enklere å detektere og identifisere. De andre peptidene er imidlertid godt identifisert ut fra minst to m/z verdier for peptidet og retensjonstid.

## **6.2 Testing av peptid-karakteristika**

Strategien for utvelgelse av peptider som er egnede kandidater for deteksjon av NSE, er presisert under avsnitt 4.6 Strategi.

### **6.2.1 Spesifisitet**

Produktene som er presentert som spesifikke produkter i tabell 6-1 er spesifikke for gamma-enolase i forhold til isoenzymene alfa og beta-enolase. Etter matching mot databasen *Bioanalytical Research Group* (se avsnitt 5.3.4 i Metode og Materialer) ble peptidsekvensene som ikke er spesifikke i forhold til alle plasmaproteiner eliminert. Følgende peptidsekvenser er utelukkende å finne i NSE:

- 64-88
- 89-102
- 126-131
- 132-161
- 162-178
- 183-192
- 202-227
- 239-252
- 262-268
- 269-284
- 285-305
- 306-325
- 343-357
- 358-371
- 412-421
- 422-428

Ikke uventet er de fleste peptidsekvensene som består av 6 aminosyrer eller mindre (utenom peptidsekvens 126-131), ikke spesifikke i forhold til andre plasmaproteiner. Disse peptidene ble dermed ikke ansett som aktuelle peptidkandidater.

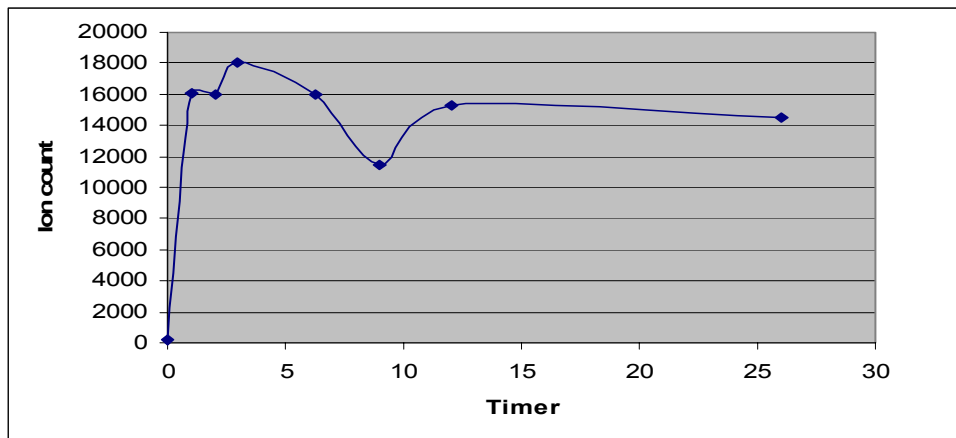
### **6.2.2 Bestemmelse av digest endepunkt**

Dannelsen av peptidprodukter over tid øker ettersom mer og mer av proteinet klippes opp, og mengde intakt protein minker proporsjonalt. Ikke alle peptidene klippes nødvendigvis i samme tempo; noen når endepunkt for klippen senere enn andre. Det vil derfor være viktig å finne peptidprodukter som når dette endepunktet etter klipp over natt, slik at generering av disse peptidene vil være reproducerbart. Mengde peptider etter klipp må representere mengde protein.

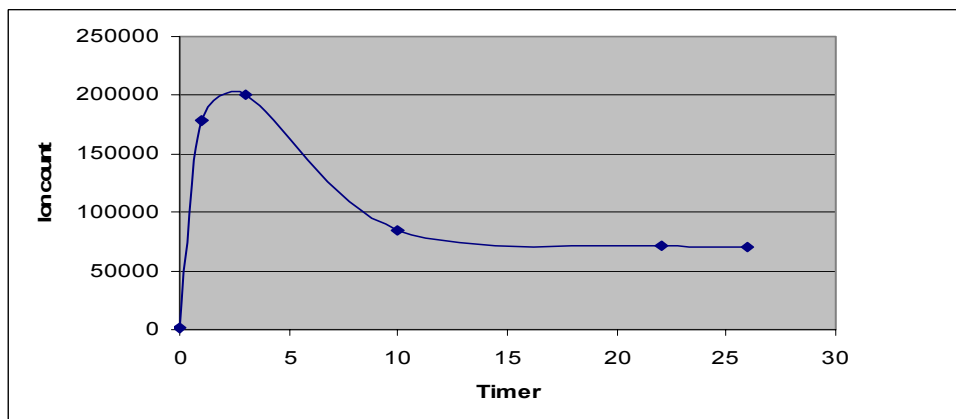
For å følge produktdannelse over tid, ble prøver tatt ut ved bestemte tidsintervaller. Intensiteten til peptidproduktene fra tabell 6-1 ble monitorert. Det ble sett på to ulike  $m/z$  verdier for hvert av peptidene, og snittet av intensiteten til disse verdiene ble regnet ut. Resultatene for noen peptider vises i figur 6-5.



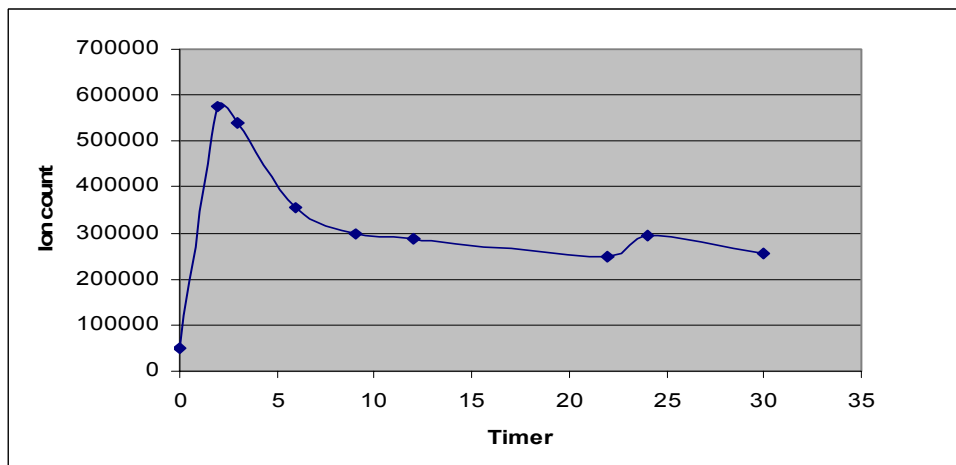
(A)



(B)



(C)



Figur 6-5: Produktdannelse for peptid 358-371 fra (A) tid lik 0 til tid lik 26 timer, proteinkonsentrasjon 8  $\mu\text{g/ml}$  (B) tid lik 0 til tid lik 26 timer, proteinkonsentrasjon 20  $\mu\text{g/ml}$  (C) tid lik 0 til tid lik 30 timer, proteinkonsentrasjon 40  $\mu\text{g/ml}$

Figur 6-5 (A) viser en kraftig økning i produktdannelse frem til tid lik 5 timer, deretter synker intensiteten til produktene litt før den flater ut. I dette eksperimentet var proteinkonsentrasjonen 8 µg/mL. Dette viste seg å være et typisk mønster for flere produktene, selv om enkelte produkter varierte betraktelig mer i intensitet enn for gjeldende eksempel. For eksperimentene hvor konsentrasjonen var høyere, henholdsvis 20 µg/mL (figur 6-5 (B)) og 40 µg/mL (figur 6-5 (C)) var nedgangen i intensitet enda kraftigere mot slutten.

Ut fra fasongen på grafene i figur 6-5 kan det tenkes to muligheter: den ene er at peptidene degraderes etter en viss tid. Den andre muligheten er at nedgangen i signalintensitet hos peptidene skyldes undertrykking av ioner i elektrospy.

Siden peptider og proteiner inneholder aminosyrer med mange funksjonelle grupper er de dermed utsatt for kjemiske endringer. Det finnes mange degraderingsreaksjoner som kan være ansvarlig for denne ustabiliteten. De vanligste reaksjonen er oksideringsreaksjoner, reduksjon, deamidering, hydrolyse, argininkonversjon,  $\beta$ -eliminering og racemisering (Reubsaet, Beijnen et al. 1998). Av disse er det kanskje mest sannsynlig at oksidering av peptidene har forekommet, da dette er en svært hyppig forekommende reaksjon.

Det ble forsøkt lett etter mulige degraderingsprodukter ved å kjøre et bredt scan. Så ble det foretatt ioneuttrekk på verdier som tilsvarer massen til peptider pluss eller minus massen som gitte reaksjoner ville gi, for eksempel som følge av oksidering. Oksidering ville gi peptidet en mer hydrofil og polar karakter, som igjen ville kunne gi en noe kortere retensjonstid enn for foreldrepeptidet. Oppgaven med å finne degraderingsprodukter er i seg selv svært stor, og ble derfor ikke prioritert videre. Det ble imidlertid bestemt å ta hensyn til faktorer som kan fremskynde degraderingsprosesser, da spesielt varme. Fremtidig inndamping av prøver i SpeedVac bør derfor skje uten ekstra lys og høy temperatur selv om dette er tidsbesparende.

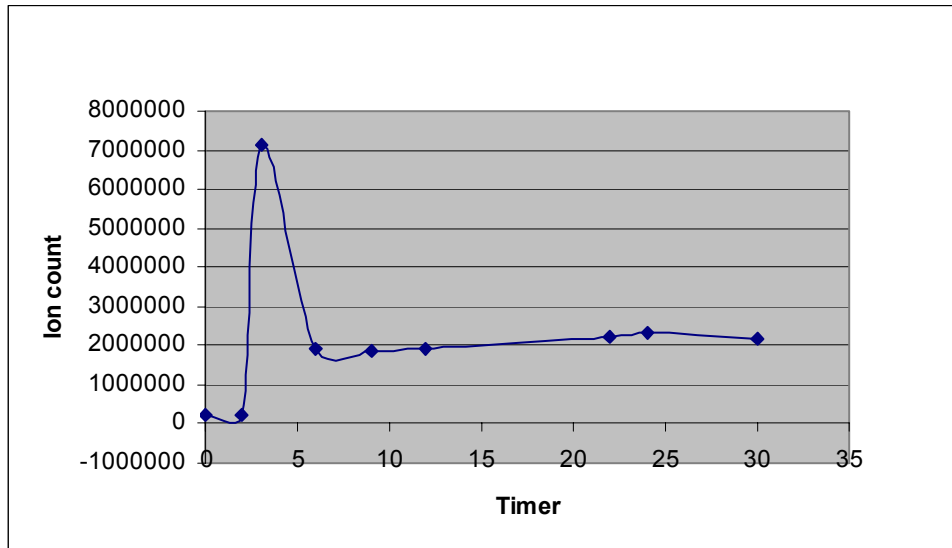
Undertrykkelse av ioner forårsakes av konkurranse om overflaten til dråpene ettersom overflaten blir mindre under Coulomb eksplosjon, eller av maskering av ladning og

dermed analytten av interesse, av mot-ioner (Reubsaet 2003). I vandige prøver er sistnevnte uaktuelt. Peptidmengden som finnes i prøvene som tas ut underveis i klippen, øker. En andel av peptidmengden kan da bli utsatt for ioneundertrykkelse, hvilket forringer deteksjonen. Dette stemmer godt overens med observasjonene som ble gjort for økende konsentrasjoner protein; det ble observert en større nedgang i intensitet mot slutten av klippen for prøvene på 20 µg/mL og 40 µg/mL enn for prøvene på 8 µg/mL. Denne tendensen kan testes: ytterligere nedgang i proteinkonsentrasjon før klipp kan gi et mer korrekt bilde av forløpet til den tryptiske klippen, da lavere peptidkonsentrasjon vil være mindre utsatt for ioneundertrykkelse.

Nedgangen i intensitet til peptidproduktene kan være en kombinasjon av både ioneundertrykkelse og dannelsen av degraderingsprodukter. Forskjellen mellom denne ustabiliteten til peptidene var svært varierende, og enkelte peptider så heller ikke ut til å nå endepunktet for digest innenfor tidsrommet på et døgn. Utflatning av kurven mot slutten er viktig da denne illustrerer endepunktet for klippen. Dette er faktorer som det ble tatt hensyn til ved eliminering av uegnede peptider, basert på resultatet for testing av flere peptid-karakteristika.

Figur 6-6 nedenfor viser produktdannelse for summen av 4 peptider som sammen illustrerer hvordan disse når et endepunkt i klippen i løpet av 30 timer. De fire peptidproduktene er spesifisert i tabell 6-3.

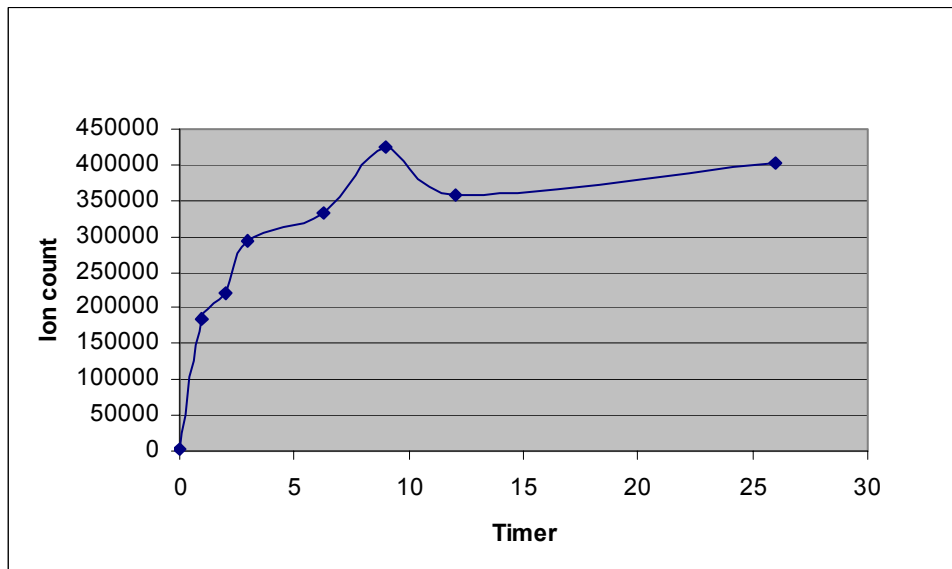
.



Figur 6-6: Produktdannelse for summen av 4 peptider fra tid lik 0 til tid lik 30 timer.

Proteinkonsentrasjon 40  $\mu\text{g/ml}$

For å sjekke at klippen med trypsin var vellykket ble produktdannelsen til cytochrom C over tid monitorert. Denne er presentert i figur 6-7. Grafen viser at klippen er vellykket, og at forholdene for klippen dermed er tilfredsstillende.



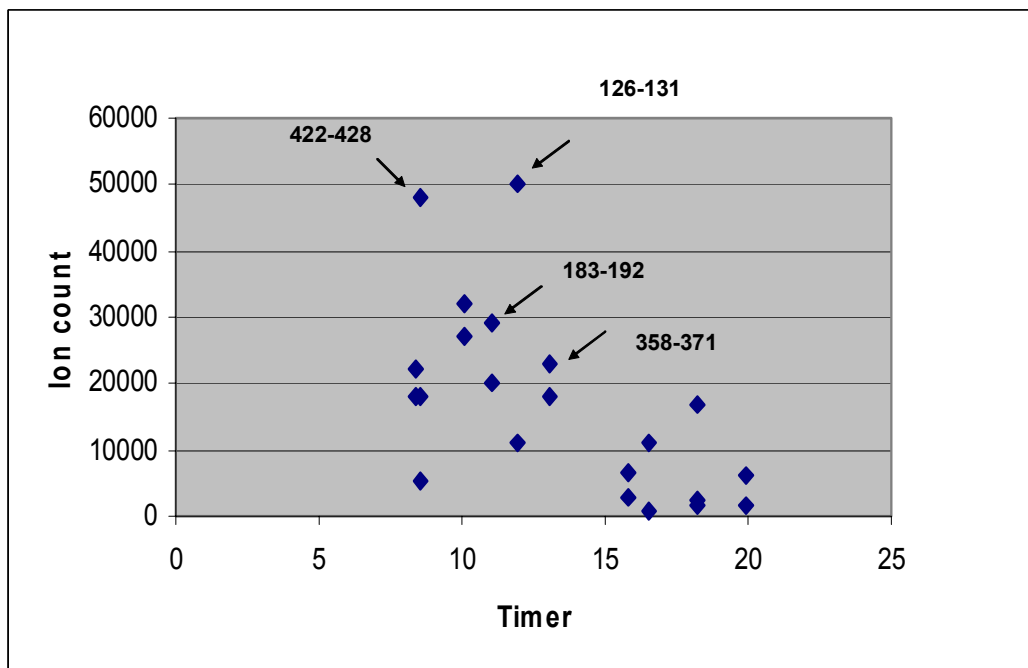
Figur 6-7: Produktdannelse av cytochrom C fra tid lik 0 til tid lik 26 timer.

Proteinkonsentrasjon 8  $\mu\text{g/ml}$

### 6.2.3 Intensitet

Når et protein skal klippes opp av en protease, vil deler av proteinet klippes enklere enn andre. Proteinets folding vil være avgjørende for hvor tilgjengelig de ulike delene av proteinet er for proteasen. Peptidene som sitter slik til i proteinet at de enkelt klippes av trypsin, vil kunne forekomme i høyere intensitet enn for eksempel sekvenser som ligger innerst i foldingen til proteinet. Peptidprodukter vil også kunne være fullstendig dannet men likevel ha lav intensitet i kromatogrammet. Dette skjer hvis peptidproduktene har lav ioniserbarhet i ESI. For å komme ned i så lave deteksjonsområder som overhode mulig, er det viktig å velge ut peptidene som har høyest intensitet, som markører for NSE. En tryptisk klipp av NSE ble derfor analysert, og den relative intensiteten til peptidene ble målt. Peptidene med høyest signalintensitet ble selektert videre, mens peptidene som viste lav signalintensiteter ble eliminert.

I figur 6-8 nedenfor er den relative intensiteten til flere peptider plottet. Bare de mest aktuelle kandidatpeptidene til å monitorer NSE er angitt.

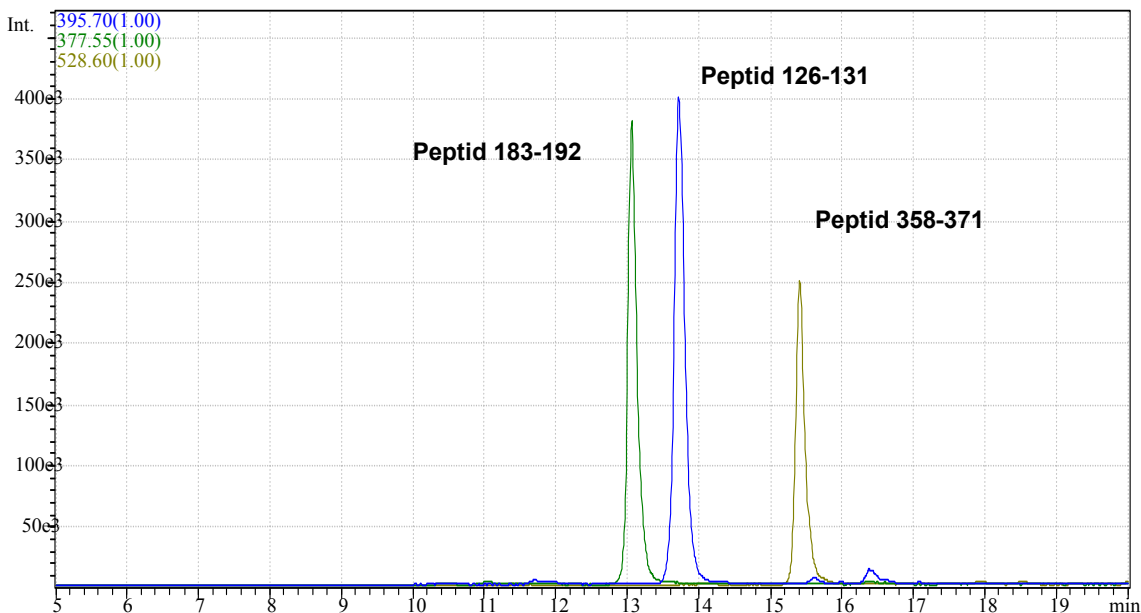


Figur 6-8: Peptidenes signalintensitet plottet mot retensjonstid

#### 6.2.4 Analytiske hensyn: egnet retensjon av analytt på kolonne

For å lage en effektiv analysemetode, er tiden en avgjørende faktor. Det er ikke ønskelig med peptider som har svært lang retensjonstid. Samtidig er det viktig med tilstrekkelig god retensjon av analytt på kolonnen slik at peptidene ikke eluerer ut i fronten, da dette forringer deteksjonen. Retensjonen henger ofte sammen med antall aminosyrer i peptidet. Små hydrofile peptider eluerer ut først. De større, mer hydrofobe peptidene retarderes på kolonnen, og eluerer dermed ut på et senere tidspunkt. Ettersom kjedene til peptidene øker i lengde, er det de kjemiske egenskapene til aminosyrene som i større grad enn antall aminosyrer avgjør hvor godt peptidet retarderes på kolonnen.

Retensjonstiden for alle peptidene er markert i tabell 6-1. Bare peptidene med retensjonstid mellom 7 og 17 minutter ble ansett som aktuelle kandidater. I tillegg er et eksempel på tre peptider som eluerer ut med egnet retensjonstid i forhold til hverandre vist i figur 6-9.



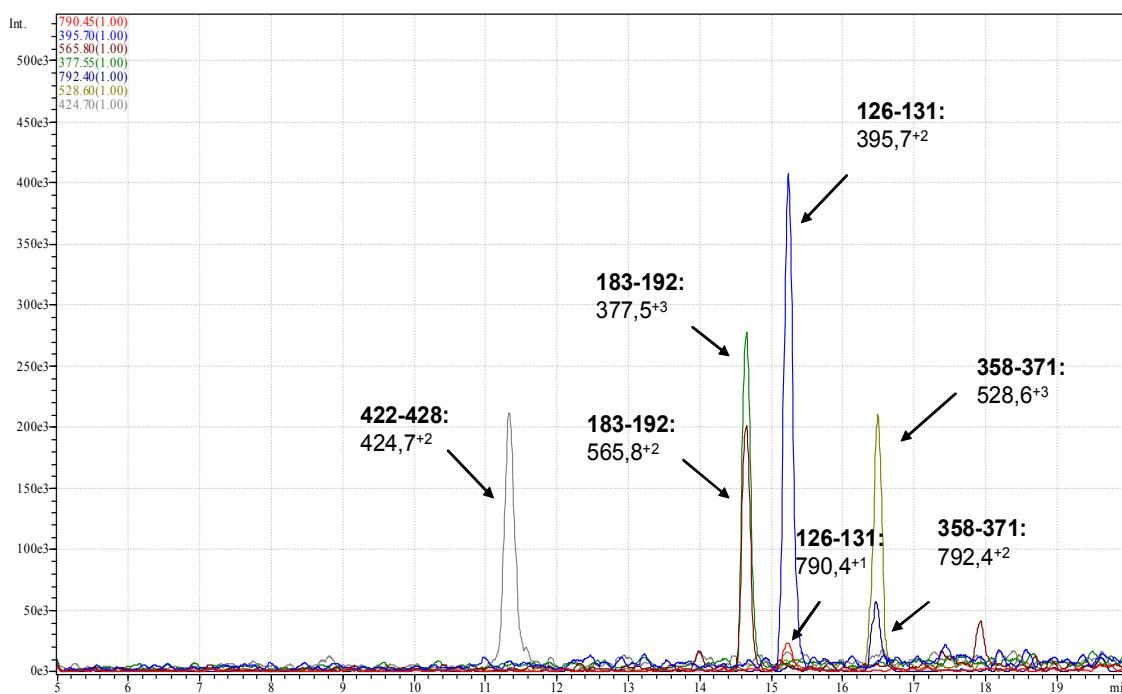
Figur 6-9: Toppene til 3 peptider som har egnet retensjonstid i forhold til hverandre og i forhold til analys tiden

Etter seleksjonen som var foretatt på grunnlag av spesifisitet, digest endepunkt, intensitet og egnet retensjon på kolonnen, var fire peptider spesielt aktuelle kandidater (tabell 6-3). Deteksjonen av aminosyresekvensene i tabell 6-3 i plasma indikerer tilstedeværelsen til NSE.

*Tabell 6-3: Peptidsekvenser som er egnede markører for NSE*

Aminosyrenummer	Sekvens	$[m+H]^+1$	$[m+2H]^+2$	$[m+3H]^+3$
126-131	ELPLYR	790,4	395,7	
183-192	LGAEVYHTLK		565,8	377,5
358-371	LAQENGWGMVSHR		792,4	528,6
422-428	FAGHNFR		424,7	283,5

Figur 6-10 viser kromatogrammet til peptidene fra tabell 6-3. Disse benyttes videre i oppgaven. Her kan den relative retensjonstiden og intensiteten til alle peptidene sees.



*Figur 6-10: Kromatogram av de fire utvalgte peptidene som er best egnede som markører for deteksjon av NSE*

### ***6.3 Forberedelser til prøveoppbeidelse i plasma***

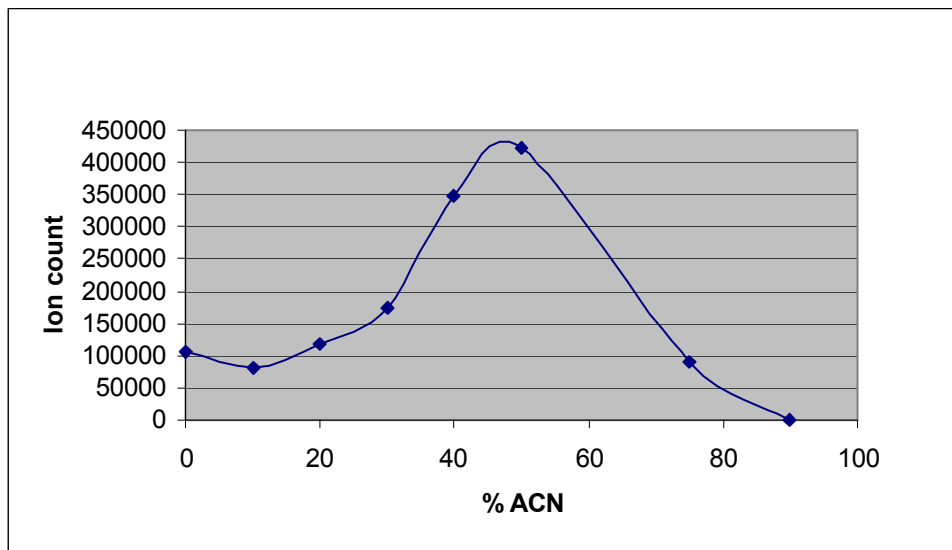
Proteinfelling med ACN er en vanlig prøveoppbeidelse i plasmaprøver. Når visse proteiner i plasma skal bestemmes er det viktig å styre fellingene slik at man blir kvitt noen proteiner men ikke målproteinet.

#### **6.3.1 Felling av NSE med ACN i vandige prøver**

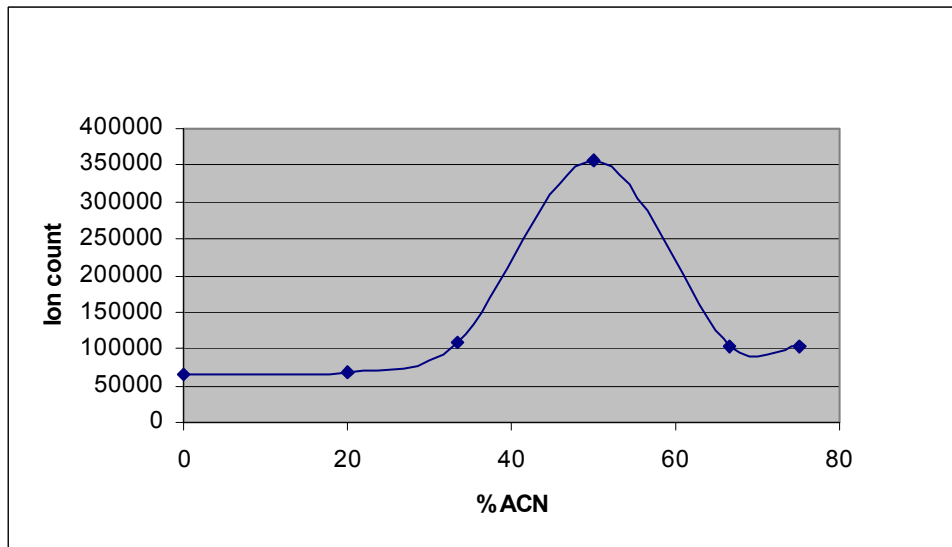
For å kunne si noe om hvilke mengder ACN som feller NSE, ble det gjort en forsøksrekke hvor vandige løsninger med NSE ble tilsatt ACN i økende forhold. Mengde NSE i supernatanten (se avsnitt 5.3.5 Materialer og Metode) som funksjon av prosentandel ACN er vist i figur 6-11.



(A)



(B)

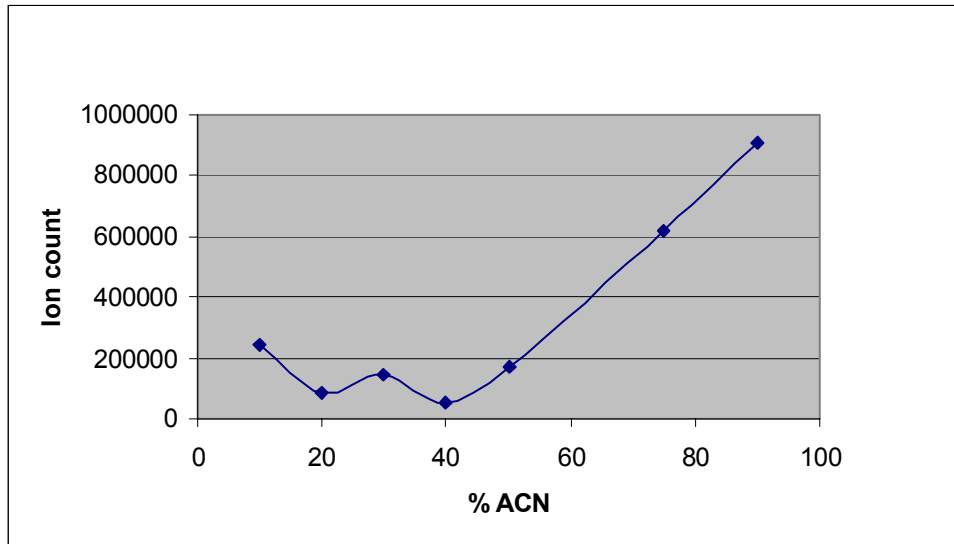


Figur 6-11: NSE i supernatant som funksjon av prosentandel ACN. ACN er benyttet i følgende prosentmengder: (A) 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 90 % (B) 0, 20, 33,33, 50, 66,66, 75 %

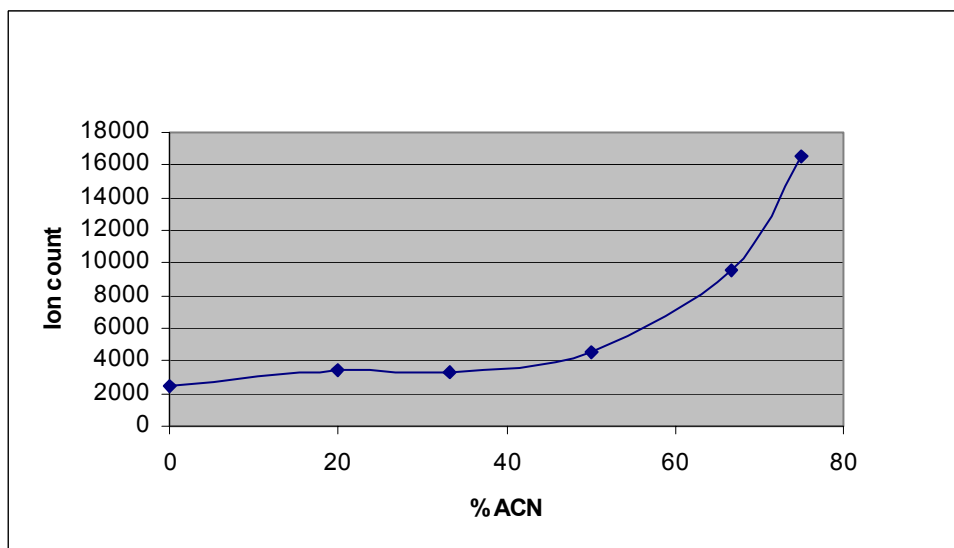
Figur 6-11 viser hvordan mengde NSE i supernatant minsker i felling med ACN i forhold utover 50 %. Dette er i tråd med tidligere observasjoner fra andre fellingsforsøk av proteiner med ACN (Winther and Reubsæet 2006). Det som derimot var overraskende var stigningen til kurven i første halvdel av grafen. Det ser ut som om mengde protein i

supernatanten øker med økende prosentandel organisk løsemiddel; frem til 50 % hvorpå utfellingen starter. Forsøket er reproducerbart. Bunnfallet fra de ulike fellingene i begge fellingsseriene ble reløst og tilsatt trypsin for klipping. De ble så analysert med hensyn på NSE-innhold. Resultatene er presentert i figur 6-12.

(A)



(B)



Figur 6-12: NSE i bunnfall som funksjon av prosentandel ACN. ACN er benyttet i følgende prosentmengder: (A) 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 90 % (B) 0, 20, 33,33, 50, 66,66, 75 %. Anmerkning:(A) Prøven som ble felt med 0 % ACN er ikke med, da denne ble ødelagt

Mengde peptider i bunnfallet øker ettersom prosentandelen ACN som det er felt med, øker. Det kan med sikkerhet konkluderes med at NSE i løsning starter å felle ut når det tilsettes mer enn 50 % ACN til løsningen. Grunnen til lavere NSE verdier ved lavere ACN konsentrasjoner kan ikke forklares.

Deteksjonen er rettet mot fire utvalgte peptidprodukter etter NSE-klipp med trypsin. Det er derfor ikke mulig å si noe om mengde uklippet protein, eller peptidprodukter som er ufullstendig klippet, i verken supernatanten eller bunnfallet. Dette faller utenfor deteksjonsspesifikasjonene til MS. En tanke kan være at ettersom mengde organisk løsemiddel i løsning øker, denatureres NSE på en irreversibel måte. NSE blir på denne måten mer og mer tilgjengelig for trypsin for klipping. Når deteksjonen er basert på klippeproduktene til NSE, og selve klippingen av NSE viser seg å bli bedre og bedre med økende mengde løsemiddel, vil ikke deteksjon av peptidproduktene være representative for faktisk mengde protein i løsning.

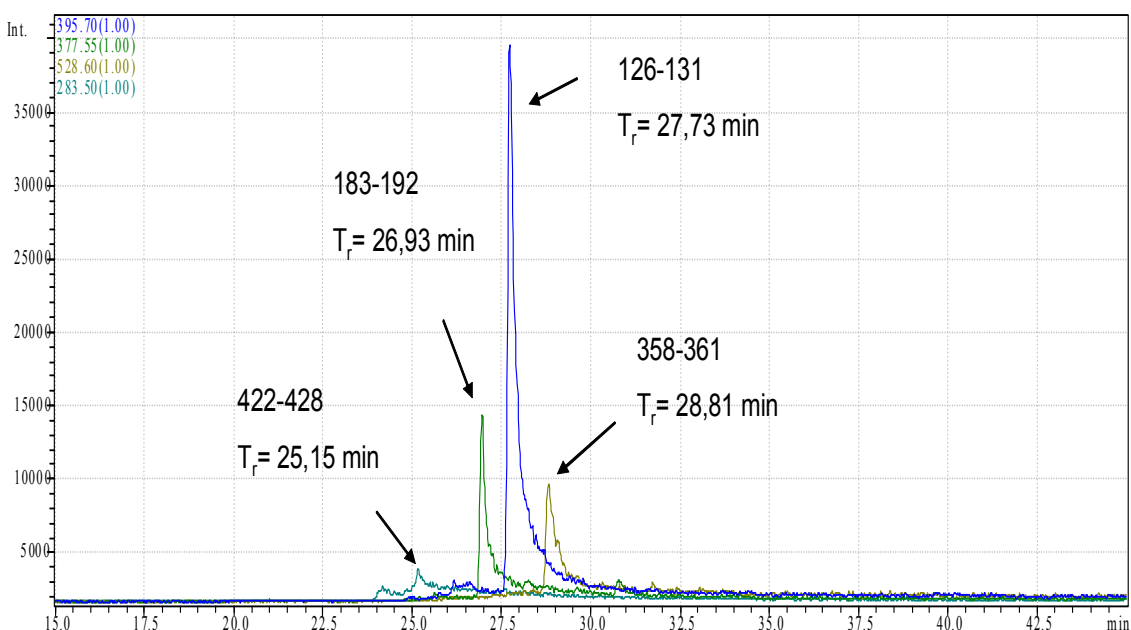
Dette er kun en hypotese. For å eventuelt å bekrefte dette kunne man tenke seg følgende forsøk: supernatanten som er igjen etter felling av vandig NSE-løsning med 10 % ACN, reløses i en blanding av TEA og ACN (10:90), rystes godt opp, og settes så til inndamping igjen. I følge hypotesen vil nå NSE være irreversibelt denaturert. Når væskefase er dampet av reløses da bunnfallet på nytt, denne gang i ren TEA, tilsettes trypsin og settes til klipp over natt. Om det dannes mer peptider enn ved 10 % ACN felling, er det antydning på validiteten til hypotesen: økende mengde organisk løsemiddel denaturerer NSE på en irreversibel måte som fører til en forbedret tryptisk klipp av NSE.

Fellingsprofilen til NSE viser at felling med 50 % ACN har følgende fordeler: NSE bevares i løsning, og denatureres muligens i tillegg. Dette gir økt tilgjengeligheten for trypsin, og fullstendig klipp. Dette er derfor utgangspunktet for prøveopparbeidelse av spikede plasmaprøver med NSE. Plasmaprøvene felles med like mengder ACN som plasma, og de ferdig klippede prøvene injiserer på et utvidet LC-MS system hvor prøvene først går gjennom en RAM-kolonne (figur 5-2 og 5-3 i Materialer og Metoder) for ytterligere fjerning av andre proteiner før analyse.

## 6.4 Plasmaprøver

### 6.4.1 Felling av NSE-spikede plasmaprøver med ulike forhold ACN

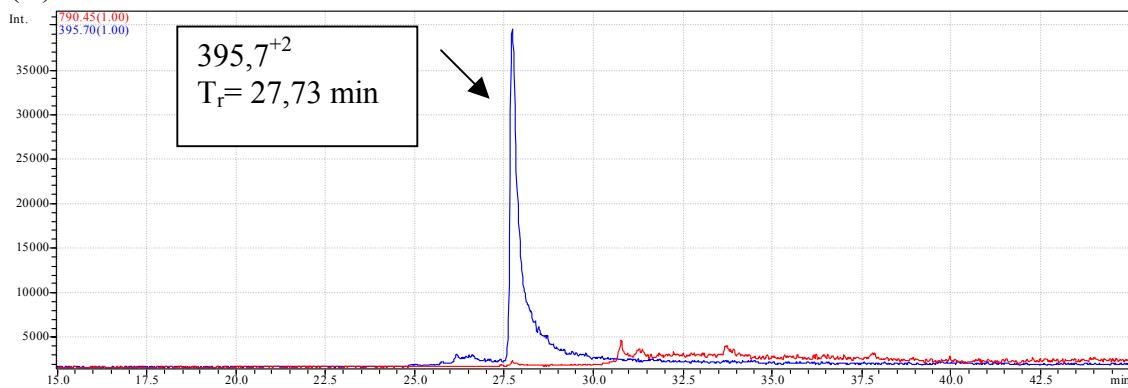
For analysene av plasmaprøver ble LC-MS oppsett med RAM brukt (se figur 5-2 og 5-3, og tabell 5-11 under Materialer og Metode). En fellingsprofil for plasmaprøver spiket med NSE ble forsøkt kartlagt for å se om dette stemte med fellingsprofilen til NSE i vandige prøver. Figur 6-10 viser referansetid for de 4 peptidene på dette systemet.



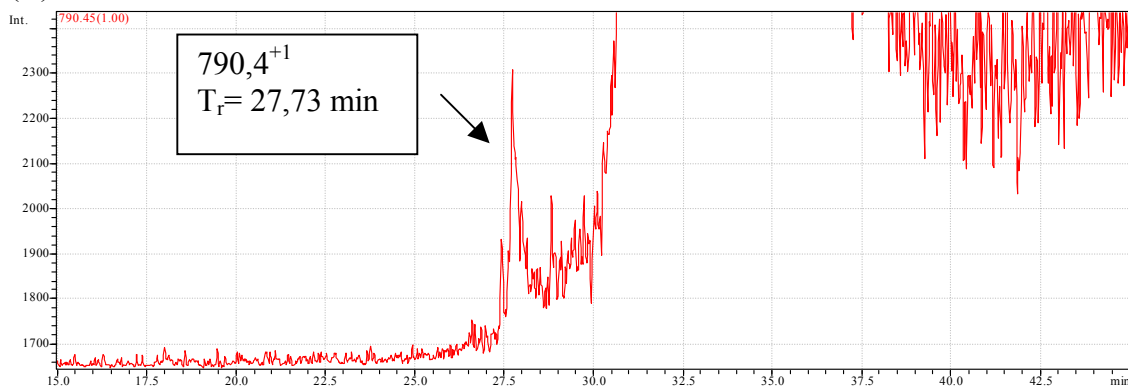
Figur 6-13: Kromatogram for analyse av vandig prøve med NSE. De fire spesifikke peptidene som er valgt ut som markører for NSE er merket av med retensjonstid i kromatogrammet

Figur 6-14 og 6-15 viser kromatogrammer for peptidsekvens 126-131. Spikede plasmaprøver ble felt med ACN, og sammenliknet med blanke plasmaprøver.

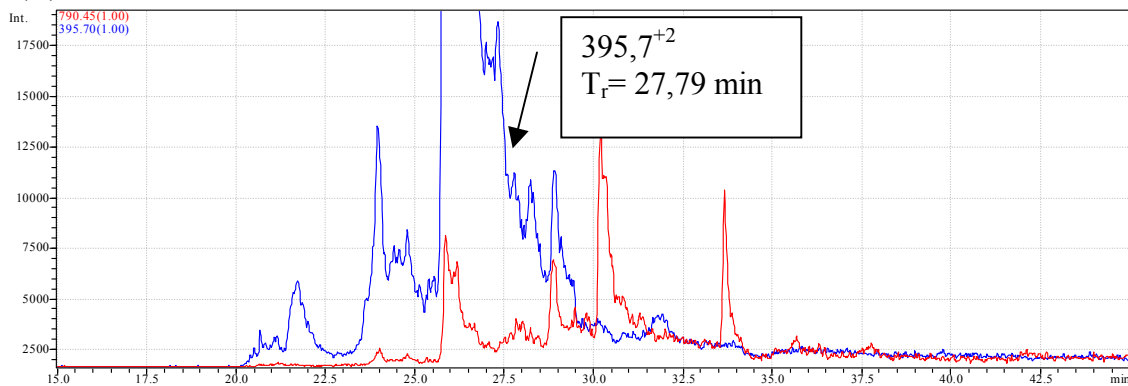
(A)

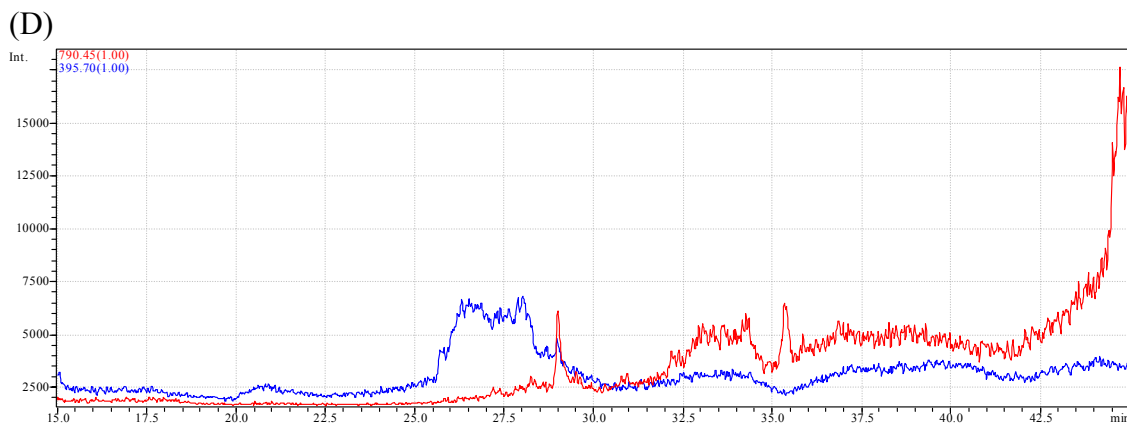


(B)



(C)





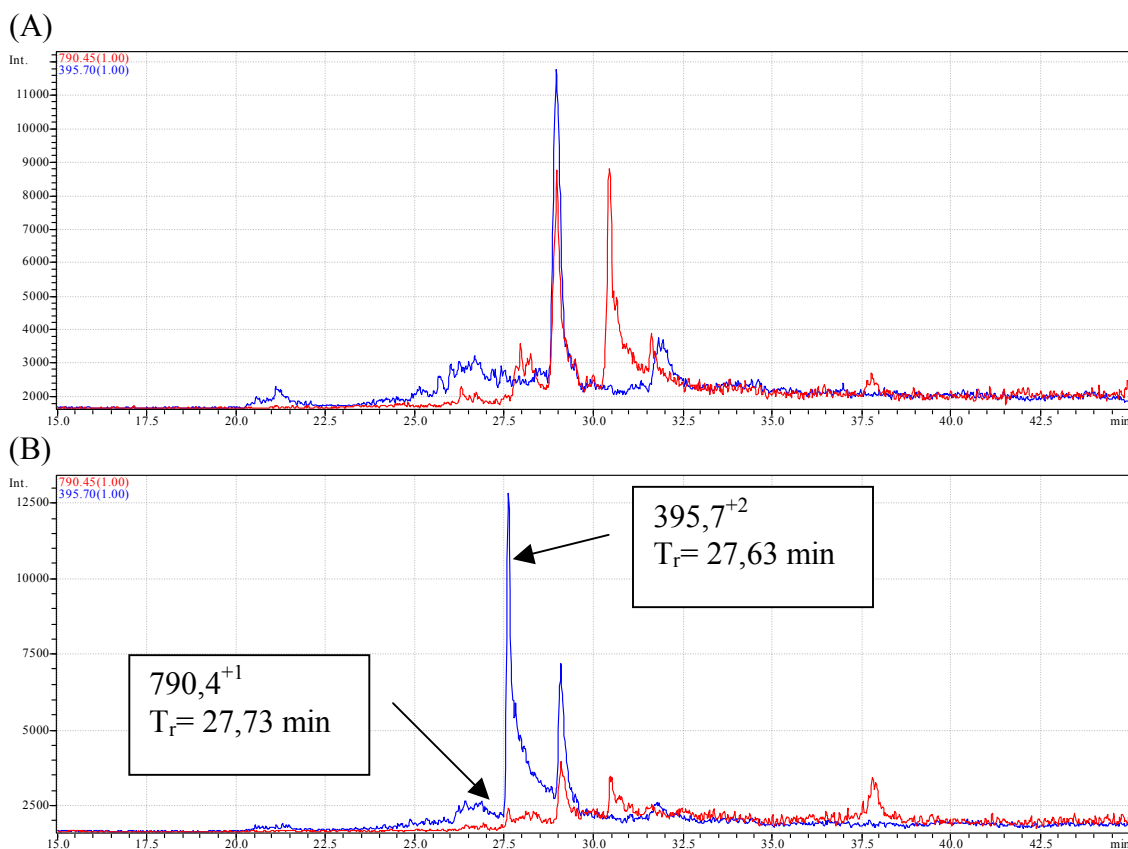
Figur 6-14: Alle kromatogrammene gjelder peptidsekvens 126-131.  $m/z$  verdi er spesifisert for hvert kromatogram. (A) og (B) Vandig prøve med NSE.  $T_r = 27,73$  minutter (C) Spiket plasmaprøve med NSE, felt med 50 % ACN.  $T_r = 27,79$  minutter (D) Blank plasma felt med 50 % ACN. Ingen topper ved tid lik 27,79 minutter

I figur 6-14 (C) sees det en liten topp på ryggen til en større topp ved  $t_r$  lik 27,79 minutter. Dette stemmer godt overens med referansetiden på 27,73 minutter fra analysen med vandig prøve (figur 6-14 (A) og (B)). Den blanke plasmaprøven som også ble felt med 50 % ACN viser ingen topper ved denne tiden (figur 6-14 (D)). Selv om toppen ikke er tydelig, tyder dette på at peptidsekvens 126-131 i NSE er gjenfunnet i spiket plasmaprøve.

For å bekrefte at toppen ved tid lik 27,73 minutter faktisk er peptid 126-131, ble en plasmaprøve spiket med 60 % ACN analysert (figur 6-15 (A)). Derneft ble samme prøven tilsatt ferdig klippet NSE fra vandig prøve og analysert på nytt (figur 6-15 (B)). Her sees en tydelig topp ved  $t_r$  lik 27,63 minutter. Dette forsterker teorien om at peptidsekvens 126-131 i NSE er gjenfunnet i spiket plasmaprøve.

Plasmaprøvene ble felt med ulike mengder ACN. Da ikke noen umiskjennelig topp for dette peptidet ble funnet igjen gjennom hele forsøksrekken, ble ingen fellingsprofil for plasmaprøver kartlagt. Samme prosedyre ble utført på de 3 peptidene fra tabell 6-3. Ikke alle disse ble gjenfunnet i plasma. Dette tyder på at videre arbeid med prøveopparbeidelse gjenstår. Den tryptiske klippet av NSE i plasmaprøver må optimaliseres. Her foreslås det pre-digest av plasmaproteinene med Lys-C, da dette er et veletablert behandlingstrinn i

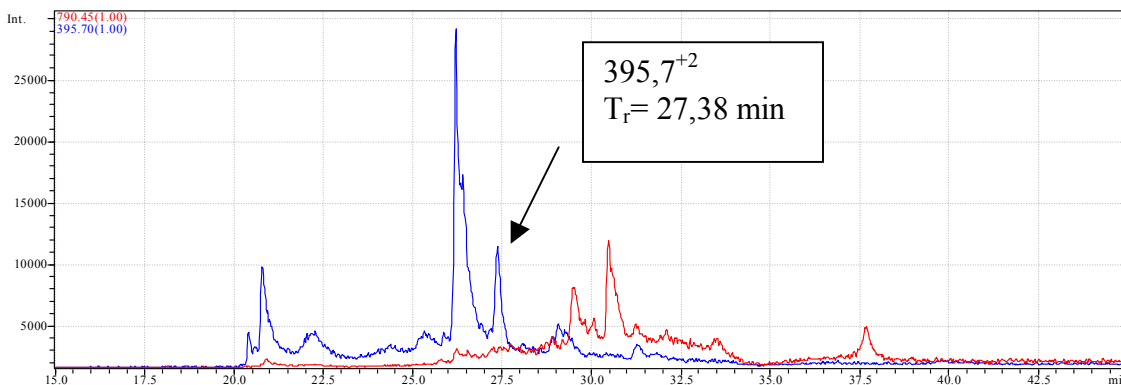
prøveopparbeidelse av plasmaprøver(Choudhary, Wu et al. 2003; Reubsæet 2006). Hvis dette gir bedre resultater, tyder dette på at det er klippen i plasmaprøver og ikke prøveopparbeidelsen som må optimaliseres.



Figur 6-15: Alle kromatogrammene gjelder peptidsekvens 126-131.  $m/z$  verdi er spesifisert for hvert kromatogram. (A) Spiket plasmaprøve med NSE, felt med 60 % ACN. Ingen topp ved tid lik 27, 73 eller 27,79 minutter. (B) Spiket plasmaprøve med NSE tilsatt ferdig klippet vandig NSE.  $T_r = 27,63$  minutter

#### 6.4.2 Pasientprøve

For å få bekreftet at metoden fungerer i praksis, ble den utprøvd på en pasientprøve fra en SCLC-diagnostisert pasient. Konsentrasjonen av NSE var av Det Norske Radiumhospitalet beregnet til 235 µg/L. Se figur 6-16.



*Figur 6-16: Pasientprøve fra SCLC-diagnostisert pasient. Prøven er felt med 50 % ACN. NSE-konsentrasjonen er av Det Norske Radiumhospitalet beregnet til 235 µg/L*

En topp med signalintensitet godt over ti ganger grunnlinjestøy observeres ved  $t_r$  lik 27,38 minutter. Det er her toppen til peptidsekvens 126-131 i NSE forventes. For å bekrefte identiteten til denne toppen, kan det kjøres MS-MS. I samme pasientprøve ble det funnet topper som kan tilhøre peptidsekvensene 183-192 og 358-371 i NSE.

Dette er lovende resultater som utgangspunkt for videre utvikling og optimalisering av prøveoppbehandling, trykkløst klipp og LC-MS metode for deteksjon av NSE i humant plasma.



## 7. KONKLUSJON

En strategi for utvikling av LC-MS metode for kvantitativ analyse av tumormarkøren NSE i humant plasma ble presentert i oppgaven.

Anerkjente fortrinn ved kromatografi og deteksjon av proteolytisk klippede peptidsekvenser fra målproteinene gjorde at proteolytisk klipping av NSE var første delmål for oppgaven. Det ble foretatt en tryptisk klipp av NSE i vandig prøve, og peptidproduktene ble identifisert. Flere peptider ble verifisert av MS-MS.

Ut fra følgende 4 kriterier ble det selektert ut peptider som var de beste kandidatene for deteksjon av NSE: 1) Spesifisitet 2) Maksimal dannelse av peptidprodukt 3) Høy signalintensitet 4) Peptidenes retensjon på C-8 kolonne. Dette var sekvens 126-131 (ELPLYR), 183-192 (LGAEVYHTLK), 358-371 (LAQENGWGVMSHR) og 422-428 (FAGHNFR).

Til prøveopparbeidelsen ble proteinfelling av spikedet plasmaprøver med ulike mengder ACN forsøkt. Felling med 50 % ACN så ut til å fungere best.

Den utviklede metoden ble testet ut på pasientprøver fra pasienter diagnostisert med SCLC. Konsentrasjonen av NSE var av Det Norske Radiumhospitalet beregnet til 235 µg/L. Peptidsekvens 126-131 hadde høy intensitet som var godt over ti ganger intensiteten til grunnlinjestøyen. For peptidsekvens 183-192 og 358-371 ble det også observert topper.

Denne oppgaven gir et godt utgangspunkt for videre arbeid med tumormarkøren NSE i pasientprøver, og bruk av LC-MS som diagnostisk verktøy. Dog er det nødvendig å optimalisere prøveopparbeidelse og tryptisk klipp av NSE i plasma innen utvikling av metode for kvantifisering av NSE påbegynnes.

## 8. REFERANSELISTE

Ahmed, N. and G. E. Rice (2005). "Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps." Journal of Chromatography B **815**(1-2): 39-50.

Bonner, J. A., J. A. Sloan, et al. (2000). "Significance of Neuron-specific Enolase Levels before and during Therapy for Small Cell Lung Cancer." Clinical Cancer Research **6**: 597-601.

Cassiano, N. M., V. V. Lima, et al. (2006). "Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography." Anal Bioanal Chem **384**: 1462-1469.

Chai, G., J. M. Brewer, et al. (2004). "Expression, Purification and the 1.8 Å Resolution Crystal Structure of Human Neuron Specific Enolase." Journal of Molecular Biology **341**(4): 1015-1021.

Choudhary, G., S.-L. Wu, et al. (2003). "Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS." Journal of Proteome Research **2**(1): 59-67.

Duncan, M. E., S. M. McAleese, et al. (1992). "A simple enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the neuron-specific [gamma] isozyme of human enolase (NSE) using monoclonal antibodies raised against synthetic peptides corresponding to isozyme sequence differences." Journal of Immunological Methods **151**(1-2): 227-236.

Ferrigno, D., G. Buccheri, et al. (2003). "Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC)." Lung Cancer **41**(3): 311-320.

Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K.E. (1998). Kromatografi.

Hale, J. E., J. P. Butler, et al. (2004). "A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis." Analytical Biochemistry **333**(1): 174-181.

Jarmalaviciene, R., O. Kornysova, et al. (2003). "Non-particulate (continuous bed or monolithic) restricted-access reversed-phase media for sample clean-up and separation by capillary-format liquid chromatography." Anal Bioanal Chem(377): 902-908.

Lamy, P.-J., J. Grenier, et al. (2000). "Pro-gastrin-releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer." Lung Cancer **29**(3): 197-203.

Liebler, D. C. (2002). Introduction to Proteomics.

- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2005). Lehninger Principles of Biochemistry.
- Niho, S., Y. Nishiwaki, et al. (2000). "Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen." Lung Cancer **27**(3): 159-167.
- Paus, E. and A. T. Myklebust (1995). "Expression and Interconversion of Neuron-Specific Enolase in Patient Sera and Extracts from Small-Cell Lung Cancer Cells." Tumor Biology(17): 271-280.
- Paus, E. and T. Risberg (1989). "Establishment and Evaluation of a Radioimmunoassay for Neuron-Specific Enolase  
A Marker for Small Cell Lung Cancer." Tumor Biology(10): 23-30.
- Rasmussen, K. E. (2002). Bioanalyse og validering av analysemetoder.
- Reubsaet, J. L. E. (2003). Use of LC-MS in Bio-analysis of Pharmaceuticals and Macromolecules, Oslo, Unipub AS.
- Reubsaet, J. L. E. (2006). Personlig meddelelse.
- Reubsaet, J. L. E., J. H. Beijnen, et al. (1998). "Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **17**(6-7): 955-978.
- Romijn, E. P., J. Krijgsveld, et al. (2003). "Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics." Journal of Chromatography A **1000**(1-2): 589-608.
- Shibayama, T., H. Ueoka, et al. (2001). "Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC)." Lung Cancer **32**(1): 61-69.
- Trauger, S. a., W. Webb, et al. (2002). "Peptide and protein analysis with mass spectrometry." Spectroscopy(16): 15-28.
- Winther, B. and J. L. E. Reubsaet (2006). "Determination of the Small Cell Lung Cancer associated biomarker pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) using LC-MS." Submitted Journal of Separation Science.

**Inernett-referanser:**

ExPASy (2006) <http://au.expasy.org/>

ProteinProspector (2006) <http://prospector.ucsf.edu/>

Bioanalytical Research Group (2006)  
<http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>